

M 2013

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO EM TRABALHADORES DE ANATOMIA PATOLÓGICA EXPOSTOS A FORMALDEÍDO

SANDRA CRISTINA PEREIRA DE CARVALHO

TESE DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

MEDICINA LEGAL

Sandra Cristina Pereira de Carvalho

Avaliação do Dano Genético em Trabalhadores de Anatomia Patológica Expostos a Formaldeído

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor João Paulo Fernandes Teixeira

Categoria – Investigador Auxiliar

Afiliação – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Resumo

O formaldeído (FA) é um dos mais importantes compostos químicos com uma gama de aplicações muito variada, desde a produção de resinas até à medicina. À temperatura ambiente é um gás incolor e inflamável com um odor pungente e intenso. É um composto biológico que ocorre naturalmente na maioria das células, tecidos e fluidos corporais. A exposição ao FA tem sido correlacionada com o aumento de risco de cancro nasofaríngeo e leucemia. Com base em dados epidemiológicos, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o FA como sendo carcinogénico para os humanos (grupo 1). O efeito genotóxico do FA foi confirmado numa ampla gama de sistemas experimentais desde bactérias a roedores. Apesar destes resultados positivos poderem providenciar uma base para a extrapolação para os humanos, os estudos citogenéticos em humanos têm tido resultados contraditórios. Evidências biológicas da toxicidade em local-distância, nomeadamente em linfócitos periféricos e medula óssea, ainda são insuficientes e conflituosas, sendo necessário estudos mais aprofundados.

Devido ao seu uso multifacetado, um número relativamente elevado de trabalhadores está exposto ao FA. A exposição ocupacional ao FA ocorre principalmente em laboratórios de anatomia patológica, onde é utilizado ao longo dos últimos 100 anos como agente preservante de tecidos. Nos laboratórios de anatomia patológica, a exposição ao FA ocorre principalmente por inalação, afetando as vias superiores. A severidade e extensão da resposta fisiológica dependem da concentração absorvida. Estudos recentes demonstraram que os níveis do FA no ar em laboratórios de anatomia patológica excedem os critérios de exposição recomendada.

A finalidade deste estudo foi avaliar o dano genético em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores de laboratórios de anatomia-patológica expostos a FA. A avaliação da exposição ocupacional a FA foi realizada através da medição da concentração de FA no ar no posto de trabalho. Para estimar o nível de exposição do FA nos serviços de anatomia patológica durante a jornada de trabalho (TWA) recorreu-se à amostragem contínua de ar no posto de trabalho, representativa do ar inalado pelos trabalhadores.

Procedeu-se também à análise de dois tipos de biomarcadores de efeito, aberrações cromossómicas e teste do cometa (pela medição da percentagem de ADN na cauda).

Para o efeito foi estudada uma população de 75 profissionais de Serviços de Anatomia Patológica, expostos a FA no seu ambiente laboral e uma população de 76 indivíduos com historial de não exposição a FA a nível ocupacional, com características sociodemográficas semelhantes ao grupo exposto.

Para o grupo de trabalhadores estudado, tendo em conta a jornada normal de trabalho (8 horas diárias e 40 horas semanais), obteve-se um valor médio de exposição a FA de 0.41 ppm. Os resultados obtidos para os indicadores de genotoxicidade demonstraram que, em média, os trabalhadores expostos apresentam maior dano genético, comparativamente com os indivíduos do grupo controlo ($P < 0.05$). Foi observado no grupo exposto um aumento significativo de aberrações cromossómicas e do comprimento da cauda do cometa. Os dados obtidos reforçam assim a ideia da utilização deste tipo de biomarcadores de efeito na avaliação dos efeitos genotóxicos da exposição a FA.

O conjunto de dados reunidos contribui assim para a caracterização da exposição a FA num contexto profissional específico, podendo, deste modo, revelar-se particularmente útil para reforçar a necessidade de alterar as práticas de trabalho de forma a salvaguardar a saúde dos profissionais. A informação recolhida será útil para as entidades responsáveis definirem os níveis aceitáveis para a exposição ocupacional a FA, assim como para a implementação de medidas preventivas. Estas baseiam-se principalmente em medidas de segurança e de higiene neste setor, tal como campanhas de boas práticas que podem ser cruciais para diminuir a exposição e o risco de efeitos negativos para a saúde.

Abstract

Formaldehyde (FA) is an important chemical compound with numerous applications ranging from the production of resins to medicine. At room temperature is a flammable and colorless gas with a strong pungent odor. It is also a naturally occurring biological compound present in the majority of cells, tissues and body fluids. FA exposure has been linked most consistently with increased risk of nasopharyngeal cancer (NPC) and leukemia. Based on available data, The *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classified FA carcinogenic to humans (group 1). FA's genotoxicity is confirmed in a variety of experimental systems ranging from bacteria to rodents. Although these positive findings may provide a basis for extrapolation to humans, the cytogenetic assays in humans have been conflicting with both positive and negative outcomes. Biological evidence of toxicity on distant-site such as peripheral lymphocytes and bone marrow is still insufficient and conflicting, thus remain to be more documented.

Because of its widespread use, a relatively large number of workers are exposed to FA. Occupational exposure to FA occurs mainly in pathology anatomy laboratories where it is being used as a tissue preservative for around 100 years. In these settings, absorption of FA occurs mainly through inhalation. Inhaled FA primarily affects the upper airways; the severity and extent of physiological response depends on its concentration in the absorbed air. Recent studies have consistently shown that the levels of airborne FA in pathology laboratories exceed recommend exposure criteria.

The aim of the study was to evaluate cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of anatomy-pathology workers exposed to FA. The assessment of the occupational exposure to FA was carried out by measuring the concentration of FA in workplace for representative working periods. It was also performed the analysis of two types of effect biomarkers to evaluate genotoxic effects, chromosomal aberrations and comet assay.

The study population was comprised by 75 workers and a control group formed by 76 individuals with the same sociodemographic characteristics and without occupational exposure history to genotoxic compounds. The data obtained from both groups were compared and analyzed.

The mean value of FA exposure for the exposed workers was 0.41 ppm (8 hours and 40 weekly hours). Concerning to the genotoxicity biomarkers studied, the levels of chromosomal aberrations and DNA damage, evaluated by comet assay, were significantly higher in the exposed group when compared with the control group ($P < 0.05$). This data emphasize the idea of the application of this type of biomarkers to assess the genotoxic effects of exposure to FA.

The pooled data contributes to the characterization of exposure to FA in a professional context and can therefore be particularly useful to reinforce the need to change work practices to safeguard health professionals. Moreover, the gathered information will be useful for those responsible for setting acceptable levels of occupational exposure to FA and entities that have the oversight of the health surveillance of workers.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos os que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho. A todos eles deixo aqui a minha sincera e eterna gratidão.

Agradeço a todos os profissionais de Anatomia Patológica que aceitaram participar neste projeto pois sem eles não teria sido possível concretizar os meus objetivos, e ainda às Instituições e aos responsáveis pelos respetivos Serviços de Anatomia Patológica por terem permitido a realização do estudo e pela sua disponibilidade. Agradeço igualmente à instituição que me acolheu no estágio de mestrado, o Centro de Saúde Pública Dr. Gonçalves Ferreira - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto.

Ao Professor Doutor **João Paulo Teixeira** por me aceitar como sua aluna de Mestrado e por todo o apoio, incentivo e, sobretudo, a orientação científica, assim como pela oportunidade de realizar um estágio que se revelou muito enriquecedor em termos de conhecimentos científicos.

À **Solange Costa** por todo o conhecimento que me transmitiu, todo o apoio prestado e pela paciência e dedicação ao longo deste tempo de trabalho. Obrigada do fundo do coração por tudo o que me ensinaste e pelo tempo que me deste, nesta etapa também difícil e trabalhosa da tua vida.

Ao todo o pessoal da Unidade de Saúde Ambiental, Dra. Paula Neves, Dra. Lúcia Aguiar, Dra. Diana Mendes, Dra. Ana Mendes, pela amizade e apoio que me prestaram. Em especial, à Doutora **Susana Silva** e à Doutora **Carla Costa**, por todos os conhecimentos que me transmitiram e por todo o apoio que me deram ao longo do meu estágio. E, claro, à minha companheira de “percalços” **Fátima Brandão**, pela amizade e pelos bons e menos bons momentos que passámos ao longo desta etapa que iniciámos juntas.

Agradeço à Professora **Beatriz Porto**, por me ter despertado o interesse no campo das instabilidades cromossómicas e me ter elucidado neste vasto e importante campo.

Agradeço ainda à Professora **Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa** pelo incansável e imprescindível apoio que me prestou e pela confiança que depositou em mim, pois sem ela não me seria possível ter iniciado e concretizado este trabalho.

À minha família e ao meu namorado por estarem sempre presente nos bons e nos maus momentos e por todo o apoio e acompanhamento que me deram ao longo desta intensa jornada.

Um grande obrigado a todos os que estiveram presentes nesta minha caminhada.

Lista de abreviaturas

AC – Aberrações Cromossómicas

ACGIH - *American Conference of Industrial Hygienists*

AGT - *O⁶-Alkylguanine DNA alkyltransferase*

ALDH – Aldeído Desidrogenase

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

BrdU - 5-bromodeoxiuridina

CIIT - *Chemical Industry Institute of Toxicology*

Cyt-B – Citocalasina-B

DSB – *Double Strand Break*

FA – Formaldeído

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FDH - Formaldeído desidrogenase

GSH – Glutathione

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IPCS – *International Programme on Chemical Safety*

LMP - *Low Melting Point*

MN – Teste dos Micronúcleos

MNB - Micronúcleos bucais

NCI - *National Cancer Institute*

NIOSH – *The National Institute for Occupational Safety and Health*

NMP - *Normal Melting Point*

NPC – Cancro nasofaríngeo

NTP – National Toxicology Program

OMS – Organização Mundial de Saúde

OSHA – *Occupational Safety and Health Administration*

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

SCE – *Sister Chromatid Exchanges* (trocas entre cromátídeos irmãos)

STEL - *Short-term Exposure Limit*

TWA - *Time-weighted average*

VLE – Valor limite de exposição

Índice

RESUMO	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII

1 - INTRODUÇÃO	1
-----------------------	----------

1.1. FORMALDEÍDO	4
-------------------------	----------

1.1.1. PROPRIEDADES E UTILIZAÇÃO.....	4
---------------------------------------	---

1.1.2. CLASSIFICAÇÃO	7
----------------------------	---

1.1.3. METABOLISMO	9
--------------------------	---

1.1.4. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E AMBIENTAL	12
--	----

1.1.5. EFEITOS NA SAÚDE	15
-------------------------------	----

1.1.6. EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS	17
--	----

1.2. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO	21
------------------------------------	-----------

1.2.1. AVALIAÇÃO AMBIENTAL.....	21
---------------------------------	----

1.2.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	23
----------------------------------	----

Biomarcadores	24
---------------	----

Biomarcadores de exposição	26
----------------------------	----

Biomarcadores de efeito	26
-------------------------	----

Biomarcadores de suscetibilidade	27
----------------------------------	----

1.3. OBJETIVO DO TRABALHO	37
----------------------------------	-----------

2. MATERIAL E MÉTODOS	39
------------------------------	-----------

2.1. POPULAÇÃO ESTUDADA	39
--------------------------------	-----------

2.1.1. CONTATO COM AS INSTITUIÇÕES	39
--	----

2.2. METODOLOGIA	41
-------------------------	-----------

2.2.1. AVALIAÇÃO AMBIENTAL.....	41
---------------------------------	----

2.2.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	43
----------------------------------	----

3. RESULTADOS	49
----------------------	-----------

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	49
---	-----------

3.2. AVALIAÇÃO AMBIENTAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	50
3.2.1. AVALIAÇÃO AMBIENTAL E BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE ESTUDADOS....	50
3.2.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	53
3.2.2.1. Influência do gênero na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados	53
3.2.2.2. Influência da idade na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados	54
3.2.2.3. Influência dos hábitos tabágicos na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados	57
3.2.2.4. Influência do tempo de exposição na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados	59
3.2.2.5. Associações entre os diferentes biomarcadores de genotoxicidade estudados	61
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXO I	85
ANEXO II	91
ANEXO III	95

Índice de Figuras

Figura 1 - Fórmula Molecular e diagrama em 3D do FA	4
Figura 2 - Metabolismo do FA	10
Figura 3- Concentração de FA no ar e efeitos na saúde	16
Figura 4 - Monitorização Ambiental e Monitorização Biológica	24
Figura 5 – Biomarcadores de dose, efeito e suscetibilidade	25
Figura 6 - SCE observada em linfócitos em metafase	31
Figura 7 - Diagrama explicativo do mecanismo de replicação das cadeias de ADN depois de incorporarem BrdU	32
Figura 8 - Micronúcleos observado em células binucleadas	33
Figura 9 - Imagens de células obtidas pelo teste do cometa	35
Figura 10 – Coletor de Ar	41
Figura 11 - Cálculo do valor de TWA para cada trabalhador numa jornada diária de trabalho de 8 horas	42
Figura 12 - Resultados obtidos referentes à influência da exposição na frequência dos indicadores gaps, quebras por célula, células aberrantes, células multi-aberrantes, aneuploidias e %TADN.	52
Figura 13- Gap num cromossoma	87
Figura 14 – Quebra num cromossoma	87
Figura 15 – Cromossoma em anel	88
Figura 16 – Cromossoma dicêntrico e fragmento	88
Figura 17 - Figura Homóloga	89
Figura 18 - Figura Radial	89
Figura 19 - Interchange	90

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do FA	5
Tabela 2 - Classificações do FA pelas principais Organizações Mundiais	8
Tabela 3 - Estimativa dos Valores Médios de Concentração de FA, nas várias fontes ambientais de Exposição	13
Tabela 4 - Valores limite de exposição ocupacional ao FA no ar (ppm) definidos pelas principais agências mundiais	22
Tabela 5 - Características da população estudada	49
Tabela 6 – Valores da concentração média ponderada de FA (TWA) e dos diferentes biomarcadores estudados para o grupo controlo e o exposto	50
Tabela 7 – Efeito do género nos diferentes biomarcadores de genotoxicidade	53
Tabela 8 – Efeito da idade nos biomarcadores de genotoxicidade, no grupo controlo	54
Tabela 9 - Efeito da idade nos biomarcadores de genotoxicidade estudados, no grupo exposto	55
Tabela 10 – Efeito dos hábitos tabágicos nos diferentes biomarcadores de genotoxicidade	57
Tabela 11 – Efeito do tempo de exposição na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade, no grupo exposto	59
Tabela 12 - Associações entre os biomarcadores de genotoxicidade estudados	61

1 - Introdução

O mundo e a sociedade tal como os conhecemos hoje em dia, sofreram enormes transformações desde a Revolução Industrial no séc. XVIII. Até essa data toda a produção de materiais era feita manualmente, sendo que, após o início dessa revolução se assistiu a uma grande evolução na área industrial. A implementação da atividade mecanizada em grande escala influenciou o nível de vida e a quantidade de substâncias poluentes produzidas. Este acontecimento histórico levou ao aumento do uso, por vezes em elevadas quantidades, de produtos químicos que se tornaram essenciais para o bom funcionamento e bem-estar das nossas sociedades. Assim o despoletar da industrialização levou ao surgimento da poluição ao nível ambiental em larga escala, o que se traduziu em consequências a médio e longo prazo nas populações e até mesmo no próprio ambiente.

Este novo modo de vida teve também um grande impacto na saúde em geral, e em especial na saúde ambiental e ocupacional.

Ao longo da nossa vida estamos rodeados de diversas fontes de agressões ao nosso organismo, que incluem desde agentes físicos, como radiações ionizantes e não ionizantes, a agentes químicos, com os quais entramos em contato, por vezes de modo muito subtil, mas que, no entanto, acabam por ter efeitos, muitas vezes detetáveis no nosso sistema.

Os efeitos nefastos provenientes do ambiente que nos rodeia, têm cada vez mais um papel preponderante no nosso estilo de vida. Assim, torna-se indispensável monitorizar as suas consequências para a saúde tanto a nível ocupacional como ambiental.

A abordagem da ligação ambiente ocupacional/saúde implica um conhecimento adequado dos riscos profissionais relativos à exposição e das respetivas repercussões sobre a saúde dos trabalhadores, que daí podem advir. Este conhecimento adquire-se através da análise do panorama global das situações de trabalho. No contexto ocupacional, a exposição a substâncias químicas é um dos fatores com maior peso nestas possíveis situações de risco, sendo conhecidas mais que 100 000 diferentes tipos, dentre as quais cerca de 200 a 300 estão atualmente classificadas como sendo mutagénicas ou carcinogénicas (Uva e FARIA, 2000). Incluídas neste grupo estão substâncias muito diferentes em termos de propriedades, nomeadamente, o arsénio, o benzeno, o formaldeído e o plutónio (IARC, 2013).

É atualmente aceite que a maioria dos cancros resulta da exposição a carcinogénicos ambientais (Uva e FARIA, 2000). A Organização Mundial de Saúde

(OMS) estima que entre 90 a 95% desses cânceros possam estar relacionados com exposição ocupacional, fatores ambientais e fumo do tabaco (Hughes, 1996).

Tendo em consideração que um indivíduo passa cerca de 1/3 da sua vida adulta no seu local de trabalho, é necessário manter esses locais nas melhores condições de salubridade possíveis de modo a reduzir o elevado número de casos de cancro resultantes da exposição ocupacional. De acordo com o reportado pela OMS em 2007, este número ronda os 200 mil casos.

No contexto ocupacional, além do cuidado requerido no que respeita ao contato com agentes físicos e biológicos, a maior preocupação está centrada nos efeitos adversos que podem surgir da utilização e do manuseamento de agentes químicos potencialmente perigosos. Sendo assim, é necessário ter em conta a identificação e as propriedades de cada um, bem como os respetivos limites de exposição. Ainda de salientar a necessidade de informação acerca da duração da exposição e a suscetibilidade dos indivíduos expostos (Albertini *et al.*, 2000).

O potencial genotóxico de um composto é um dos fatores de risco mais importantes para o aparecimento de efeitos a longo prazo, como o cancro ou efeitos a nível reprodutivo (Silbergeld, 2001). Este tipo de compostos corresponde a agentes físicos ou químicos que direta ou indiretamente são capazes de danificar o ADN nuclear. A probabilidade deste dano genético originar um efeito real na saúde do indivíduo depende da natureza do dano, da capacidade da célula para reparar e amplificar esse dano, da oportunidade que a célula pode ter ou não de expressar essa alteração e ainda da capacidade do organismo de reconhecer e suprimir a multiplicação de células aberrantes (Silbergeld, 2001).

A avaliação do dano no ADN dos linfócitos oferece informação acerca do possível efeito que o composto, na sua forma reativa, poderá provocar quando atinge os locais alvo nos tecidos. (Silbergeld e Davis, 1994). Esta avaliação do dano biológico ao nível genético pode ser determinada de diversas formas, das quais se destacam, numa fase mais precoce, a análise de mutações ao nível do ADN, as alterações citogenéticas, e numa fase mais tardia do processo, lesões pré-cancerígenas, apoptose e marcadores tumorais que se encontram em circulação sanguínea (Bhatt *et al.*, 2010).

Assim, torna-se essencial a realização de monitorização da exposição a compostos químicos, tendo como referência os níveis base e os níveis máximos aos quais as populações, ocupacional e ambientalmente podem estar expostas. Esta monitorização pode ser realizada recorrendo a duas abordagens diferentes e complementares, através de medição do agente químico no ar, que corresponde à monitorização ambiental e à medição dos compostos químicos e/ou seus metabolitos em

fluidos biológicos, assim como alterações biológicas que correspondem à monitorização biológica.

A informação proveniente desta monitorização permite proceder à implementação de medidas de prevenção e controlo adequadas e constitui um processo de rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais com a finalidade de detetar possíveis efeitos nocivos para a saúde, antes que se desenvolva um processo de doença (Amorim, 2003).

O formaldeído (FA) é um composto químico extensamente produzido a nível mundial e utilizado nos mais diversos setores, nomeadamente em processos industriais e procedimentos anatomopatológicos. A sua manipulação implica a libertação de vapores e consequente inalação por parte dos trabalhadores. A sintomatologia associada à exposição a FA é característica, com irritação das vias respiratórias superiores e olhos. Vários estudos epidemiológicos e experimentais associam a exposição ocupacional a FA com o desenvolvimento de cancro nasofaríngeo e leucemia (do tipo mielóide). Com base nos dados publicados, o FA foi recentemente classificado agente carcinogénio humano pelas principais agências mundiais. Face ao exposto, a utilização deste composto num ambiente ocupacional, nomeadamente nos serviços de anatomia patológica, pode vir a implicar graves consequências ao nível da saúde dos trabalhadores.

1.1. Formaldeído

1.1.1. Propriedades e utilização

O formaldeído (FA), CAS 50-00-0 (Figura 1) também designado por aldeído fórmico, formol, formalina, metaldeído, metilaldeído, óxido de metileno, oxometano, oximetileno, é o elemento mais simples do grupo dos aldeídos. É um composto ubíquo e à temperatura ambiente é um gás inflamável, incolor, tem um odor pungente e é altamente reativo (IARC, 2006; WHO, 2010). Devido à sua elevada reatividade, não pode ser manipulado no seu estado puro, sendo portanto comercializado em solução aquosa de 30 a 50%, denominada formol ou formalina. Esta possui na sua constituição 10 a 15% de álcool metílico (metanol) ou uma menor concentração de derivados amínicos (formamina e melamina), de modo a inibir a oxidação a ácido fórmico e polimerização a paraformaldeído (NTP, 2011).

Na ausência de água o gás FA é estável mas facilmente inflamável por fontes de calor, no entanto na presença de pequenas quantidades de água, tende a polimerizar-se espontaneamente, formando um sólido denominado paraformaldeído.

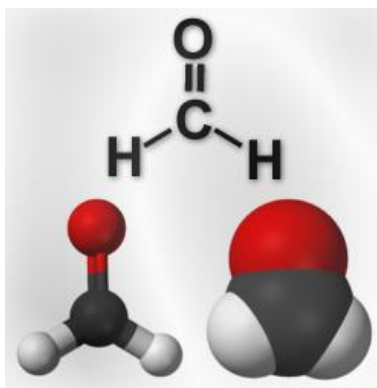


Figura 1 - Fórmula Molecular e diagrama em 3D do FA

Uma das principais questões preocupantes em termos ambientais deste composto é a sua permanência relativamente longa, em condições de elevada humidade e temperatura (WHO, 2010). As principais propriedades físico-químicas encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do FA (IARC, 2012)

Propriedade	Dados
Nome do IUPAC	Metanal
Fórmula química	CH ₂ O
Peso Molecular	30.03 g/mol
pH	2.8 – 4.0
Fator de Conversão (1atm, 25°C)	1 mg/m ³ = 1.23 x ppm
Ponto de Fusão	-19.1°C
Ponto de Ebulição	-92°C
Densidade (a 25°C)	1g/ml
Pressão de Vapor	667 Pa
Solubilidade	Água, Etanol e Clorofórmio
Limite de detecção do odor	0.8 - 1 ppm

O FA é um dos aldeídos presente em maior quantidade na atmosfera e a sua produção resulta de diversos processos naturais de oxidação de hidrocarbonetos. É um dos compostos voláteis que se forma nos estágios precoces da decomposição de resíduos vegetais no solo e encontra-se naturalmente em frutos, alimentos e mesmo no corpo humano (produzido endogenamente) (NTP, 2011).

Este agente químico foi descoberto em 1859, por um químico russo Aleksandr Mikhaylovich Butlerov, mas só em 1868 com Van Hoffman, químico alemão, é que surgiram as primeiras metodologias de produção a partir do metanol e foram estabelecidas as suas principais propriedades (Fox *et al.*, 1985). A partir daí tem vindo a ser comercializado em todo o mundo, constituindo um dos compostos mais utilizados ao nível da indústria química, tendo em 1989, atingido o vigésimo terceiro lugar em volume de produção nos EUA (WHO, 1989).

Encontra-se presente na constituição de diversos produtos, tais como produtos de limpeza, cosméticos e fumo do tabaco (em quantidades que variam entre 73,8 e 283,8 µg/cigarro), produtos fabricados com papel e emissão de fumos provenientes de fontes de combustão (Wong *et al.*, 1997). Pode também encontrar-se em elevadas concentrações em alguns ambientes ocupacionais e em menores concentrações em ambientes habitacionais (IARC, 2006). Na sua forma líquida é também muito utilizado para a fixação e preservação de tecidos, pois estabiliza os detalhes estruturais mais

minuciosos das células e tecidos, não provocando o seu endurecimento excessivo e permite o armazenamento de biópsias e peças cirúrgicas. Estas propriedades são essenciais para a visualização por microscopia e exame macroscópico das peças anatómicas, por forma a dar ou confirmar um diagnóstico para posterior estabelecimento de prognósticos e planificação de terapêuticas adequadas (Ferro *et al.*, 2005).

A produção deste composto é feita a uma larga escala a nível mundial. Segundo dados apresentados numa conferência em 2009, estima-se que haja uma produção anual de cerca de 28,2 biliões de toneladas, sendo o maior produtor o continente Asiático, com cerca de 42% da produção logo seguido pela Europa que detém cerca de 26% da mesma. Dado o crescente aumento da produção de FA, a *Merchant Research & Consulting, Ltd* (empresa inglesa especialista na investigação de todos os aspetos relacionados com o setor dos produtos químicos e indústrias) estima que a produção tenda a subir cerca de 5% por ano durante o período compreendido entre os anos de 2011 e 2015, atingindo um valor estimado de cerca de 80 biliões de toneladas em 2020, como resultado do crescente aumento da produção de materiais de construção (Kim *et al.*, 2011). Em Portugal a produção industrial de FA (sob a forma de solução aquosa a 37%) ronda por ano as 320 000 toneladas (FormaCare, 2013). A sua internacionalização é muito pouco comum (cerca de 2%) dada a sua elevada instabilidade em termos de armazenamento e transporte, sendo que as principais indústrias produtoras encontram-se geralmente presentes em locais próximos de consumo final.

Em termos de interações no organismo é um composto com propriedades eletrofílicas, podendo ligar-se ativamente a macromoléculas como o ADN, ARN, e proteínas, formando ligações cruzadas, o que se pode traduzir em danos ao nível do material genético, que poderão vir a ter consequências no processo inicial da carcinogénese, dependendo da atuação dos mecanismos de reparação do organismo (IARC, 2006).

A sua aplicação é multifacetada, sendo de grande importância a avaliação dos potenciais efeitos para a saúde humana. A sua aplicação é transversal a praticamente todas as atividades, mas centra-se principalmente em processos industriais (como produção de resinas), produtos de limpeza, aglomerados de madeira ou cortiça, alcatifas, materiais de isolamento e em laboratórios de diversas áreas, como por exemplo, ciências veterinárias e médicas, dadas as suas propriedades bactericidas na desinfeção, esterilização e preservação, sendo por isso um químico essencial à economia global (IARC, 2006).

1.1.2. Classificação

Devido ao seu uso a nível mundial em larga escala, o formaldeído (FA) tem sido, ao longo dos últimos anos, alvo de diversos estudos e a classificação relativa ao seu potencial carcinogénico tem sido atualizada pelas organizações competentes.

Em 2004, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), agência da Organização Mundial de Saúde (OMS), reclassificou o FA, passando-o do **grupo 2A**, provável agente cancerígeno, para o **grupo 1**, agente cancerígeno humano. Na base desta alteração está a publicação de dados epidemiológicos, obtidos em populações expostas ocupacionalmente, que demonstram o efeito cancerígeno do FA em humanos através da associação entre a exposição ao agente e a incidência de cancro nasofaríngeo. Num relatório de 2011 do *National Toxicology Program* (NTP), formado por várias agências governamentais dos Estados Unidos – *National Institute of Health* (NIH), *Center of Disease Control* (CDC) e *Food and Drug Administration* (FDA), o FA foi considerado como “conhecido carcinogénico humano”. Outras duas agências americanas, a *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) e o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (entidade também pertencente ao CDC), classificaram este composto como potencial carcinogénico, em 2007 e 2011 respetivamente. Por sua vez, a Norma Portuguesa 1796:2007 classifica-o como sensibilizante e agente cancerígeno suspeito no Homem (IPQ, 2007).

Atualmente, todas as definições e classificações deste composto tendem para a mesma conclusão, de que é um composto carcinogénico para humanos e pode causar danos em diversos órgãos e tecidos. As respetivas classificações, consoante as diferentes organizações mundiais, encontram-se sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificações do FA pelas principais Organizações Mundiais

Organização	Classificação do FA
ACGIH ^a	Suspeita de Carcinogénio Humano
IARC ^b	Carcinogénio Humano
OSHA ^c	Carcinogénio
NIOSH ^d	Potencial Carcinogénio
NTP ^e	Carcinogénio

^a *American Conference Of Governamental Industrial Hygienists*

^b *International Agency for Research on Cancer*

^c *Occupational Safety and Health Administration*

^d *National Institute for Occupational Safety and Health*

^e *National Toxicology Program*

1.1.3. Metabolismo

Em humanos, o formaldeído (FA) é um dos principais metabolitos intermediários na maioria das células, estando envolvido nos mais variados processos metabólicos. Está envolvido na síntese de alguns aminoácidos essenciais e secundários e é essencial na via metabólica dos carbonos, que está, por sua vez, diretamente relacionada com a biossíntese de ácidos nucleicos (WHO, 2010). É produzido endogenamente a partir de compostos como a serina, glicina, metionina e colina (Neuberger, 1961) e gerado como consequência de processos de demetilação (eliminação de um grupo metilo de uma molécula) de compostos com azoto, oxigénio e enxofre (NTP, 2011).

Sendo a principal via de exposição a inalatória, e dada a sua elevada solubilidade em água, é rapidamente absorvido e metabolizado pelos tecidos que revestem as principais vias por onde é absorvido, sobretudo ao nível do sistema respiratório (ATSDR, 1999).

A maior parte do FA inalado (cerca de 90%) é rapidamente absorvido pelas vias aéreas superiores. Na sua fase aquosa, tende a formar um composto adicional designado por formaldeídoacetal (ou metileno glicol, $\text{CH}_2(\text{OH})_2$), que, por sua vez, vai reagir com outro composto endógeno, a glutathione (GSH), formando um composto intermédio, a S-hidroxiometilglutathione (ou FA glutathione tioacetal, $\text{HO-CH}_2\text{SG}$). Este vai ser metabolizado pela enzima FA desidrogenase (FDH, também designada por álcool desidrogenase 3 – ADH3) em S-formilglutathione e esta, por sua vez, vai ser hidrolisada em GSH e ácido fórmico. Este último pode ser incorporado em produtos metabólicos, oxidado a dióxido de carbono e água, sendo deste modo excretados via exalatória, ou excretado via urinária. Esta via metabólica está representada na Figura 2, na qual estão também representadas outras vias de metabolização do FA já descritas por outros autores (Teng *et al.*, 2001; Schulte, 2006).

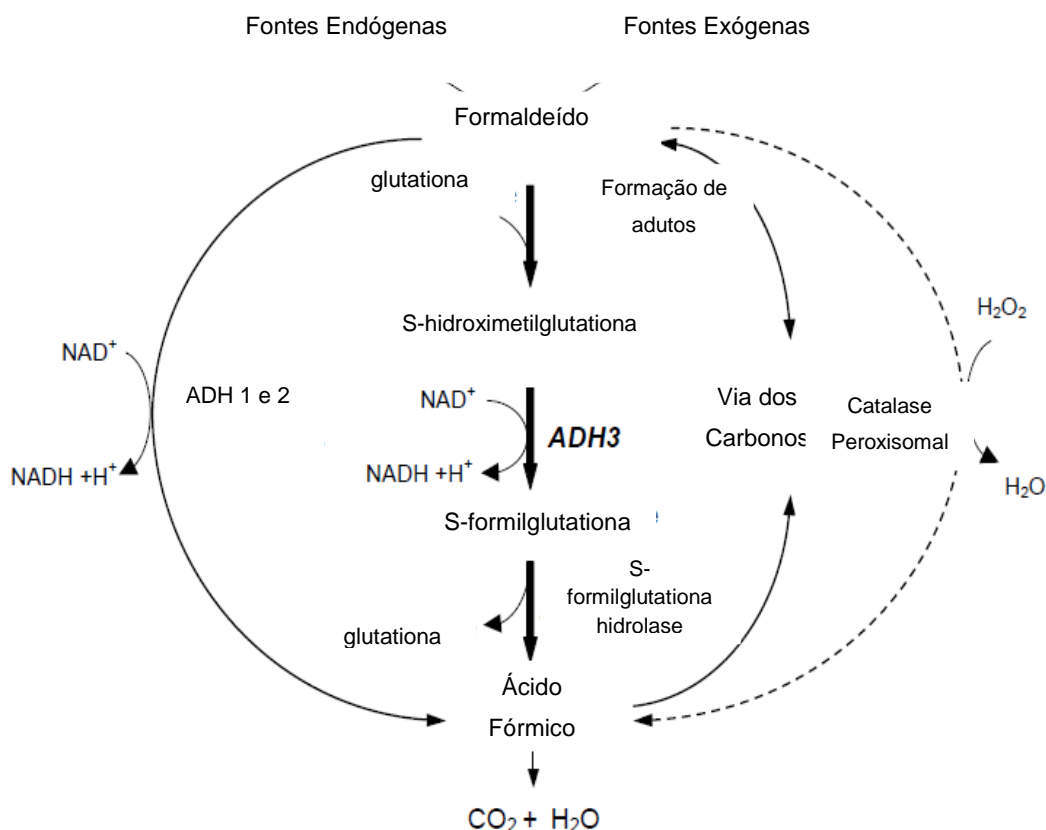


Figura 2 - Metabolismo do FA (adaptado de (Hedberg, 2001))

A concentração de FA endógeno obtida por análise por GC-MS, varia entre 2.05 e 3.09 µg/g no sangue e quando há inalação de FA não se verifica um aumento significativo da sua concentração na corrente sanguínea (sendo o valor de cerca de 2.77 ± 0.28 µg/g) (Heck *et al.*, 1985), muito provavelmente devido à sua rápida metabolização ao nível dos locais iniciais de contato e ao nível dos eritrócitos, que contêm uma elevada quantidade de enzimas FDH (Uotila e Koivusalo, 1974) e Aldeído Desidrogenase (ALDH - catalisa a oxidação dos aldeídos) (Inoue *et al.*, 1979).

Apesar do mecanismo de ação através do qual este agente poderá causar cancro não estar completamente descrito e poderem estar envolvidos diversos modos de ação, existem diversas hipóteses colocadas, nomeadamente, a possibilidade de alguns dos seus metabolitos, como é o caso do metanodiol, serem capazes de ir além dos locais iniciais de contato (Fox *et al.*, 1985) e a atuação do próprio FA sobre os ácidos nucleicos e aminoácidos (IARC, 2012). As consequências que podem advir da sua exposição compreendem diversos eventos chave no processo de carcinogénese, nomeadamente, reatividade com ADN, mutações, quebras cromossómicas, aneuploidias, efeitos

epigenéticos, dano oxidativo e citotoxicidade induzida por proliferação celular (NTP, 2011).

1.1.4. Exposição ocupacional e ambiental

O formaldeído (FA) é um composto ubíquo no ambiente, tendo sido encontradas evidências da sua presença no ar interior e exterior, solos, água e alimentos. A população em geral pode estar exposta a FA por diversas fontes naturais de onde este se liberta para o ar ambiente, nomeadamente, da oxidação de hidrocarbonetos, decomposição de resíduos vegetais e transformação de compostos orgânicos liberados da folhagem. Outras fontes de emissão possíveis, por consequência de algumas atividades humanas, como a libertação do fumo do tabaco, gases de combustão e materiais utilizados no processo de construção, na madeira prensada utilizada no fabrico de mobiliário (Mayan *et al.*, 1995), produtos de cosmética, produtos de limpeza e nalguns casos através de alimentos contaminados com este composto (NTP, 2011).

A sua concentração no ar pode variar entre 0 e 0.1 ppm, sendo as maiores concentrações encontradas no ar interior, dependendo de parâmetros como humidade e ventilação e de componentes dos compartimentos habitacionais (materiais de construção, pavimentos e mobílias).

Recentemente foi documentada a quantidade de FA a que um fumador pode estar exposto diariamente por inalação do fumo do tabaco, tendo sido obtidos valores na ordem dos 400 µg (Wang *et al.*, 2009).

Em termos alimentares, o principal fator de exposição não é a contaminação do alimento pelo composto em si, mas sim a sua inclusão como meio de preservação ou desinfetante.

O efeito cumulativo de todas estas fontes de exposição e emissão podem desencadear efeitos adversos na saúde da população. Na Tabela 3 é apresentado um resumo das concentrações médias de FA a que as pessoas estão expostas nos diferentes contextos em que estão inseridos, acima mencionados, e dos níveis de exposição resultantes dessas concentrações. Estes valores baseiam-se num *Guideline* da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a qualidade do ar interior, no qual são estimadas as concentrações médias de FA nos diferentes ambientes nos quais o ser humano passa a maior parte do seu tempo. Esses locais foram divididos assim consoante o tempo despendido em cada um (cerca de 60 a 70% no ambiente habitacional, cerca de 25% no ambiente ocupacional e cerca de 10% ao ar livre).

Tabela 3 - Estimativa dos Valores Médios de Concentração de FA, nas várias fontes ambientais de Exposição (WHO, 2000)

Fonte	Concentração (mg/m ³)	Exposição mg/dia
Ar Livre (10%)	0.001 – 0.02	0.002 – 0.04
Ar Interior		
Habitação (65%)		
Convencional	0.03 – 0.06	0.3 – 0.6
Móvel	0.1	1.0
Exposição Passiva ao Fumo do Tabaco	0.05 – 0.35	0.5 – 3.5
Local de Trabalho (25%)		
Sem exposição ^a	0.03 – 0.06	0.2 – 0.5
Com Exposição	1.0	8.0
Exposição Passiva ao Fumo do Tabaco	0.05 – 0.35	0.4 – 2.8
Consumo de Tabaco (20 cigarros/dia)	60 – 130	0.9 – 2.0 ^b

^a assumindo o valor normal de FA contido num edifício

^b concentração total de FA contida no fumo de 20 cigarros

A exposição humana a FA assume particular importância a nível industrial e no setor da saúde, onde é bastante utilizado. As suas propriedades físico-químicas, aliadas ao seu baixo custo de produção, fazem do FA um químico de uso corrente e de difícil substituição.

O consumo mundial era no ano 2000, de 21 mil toneladas (IARC, 2006) e estima-se que na União Europeia cerca de 970 000 trabalhadores estejam expostos a concentrações entre 0.5 e 1 ppm deste composto, estando envolvidas diversas indústrias (materiais de construção, plásticos, resinas) e laboratórios de anatomia patológica e histologia (IARC, 2012).

Nos serviços de anatomia patológica desenvolvem-se atividades laboratoriais que implicam a exposição dos trabalhadores ao FA através da utilização e manuseamento de formol. As principais tarefas associadas à exposição a este composto que suscitam mais preocupação em termos de risco ocupacional são a análise macroscópica das peças anatómicas, de modo a proceder à sua descrição e catalogação e ao nível do despejo das peças após essa mesma análise. Este produto é um fixador de tecidos pouco dispendioso e bastante eficiente sendo, por isso, o eleito em procedimentos de rotina anatomopatológicos. Como não provoca o endurecimento excessivo dos tecidos é

igualmente o meio preferencial para conservar e armazenar biópsias e peças cirúrgicas. Face ao exposto, torna-se evidente que o formol é um produto de uso corrente e frequente pelos profissionais dos serviços de anatomia patológica. A principal desvantagem apontada na utilização do formol é o facto de haver libertação de vapores durante o seu manuseamento, com consequente inalação por parte dos trabalhadores (Ferro *et al.*, 2005).

Neste contexto ocupacional a exposição pode ocorrer por inalação quando se liberta em forma de gás, por contacto com a pele ou área ocular ou até por ingestão accidental quando são manuseadas soluções de formalina.

Num primeiro estudo realizado em Portugal (Porto) por Mayan *et al.* (1995) sobre a exposição ocupacional ao FA de profissionais de laboratórios de anatomia patológica e histologia foram registadas concentrações de FA no ar que excediam ou eram muito próximas de 1 ppm. Sendo que nesta altura este composto estava classificado pela IARC como *provavelmente carcinogénico para os humanos* (grupo 2A) e os níveis estabelecidos pelos diversos países estavam compreendidos entre 0.05 e 0.4 ppm (IARC, 1995). O estudo demonstrou que estes trabalhadores se encontravam em situação de risco profissional. Num estudo português posterior (Ferro *et al.*, 2005), dentro do mesmo âmbito, foram encontradas quantidades elevadas de FA em laboratórios de anatomia patológica, tendo sido obtidos em alguns casos, principalmente nas tarefas de exame macroscópico de peças e adição de formol em recipientes contendo peças frescas, valores de FA muito superiores a 1 ppm.

Estes estudos, face aos resultados obtidos, evidenciaram a necessidade de implementar medidas de prevenção para garantir a segurança dos trabalhadores.

1.1.5. Efeitos na saúde

Dada a principal via de absorção deste químico ser a inalatória, a sintomatologia resultante de uma exposição a formaldeído (FA), está mais associada com as vias aéreas superiores. Os principais sintomas descritos em diversos estudos compreendem quadros de irritação ao nível da mucosa nasal, trato respiratório e ao nível ocular, para níveis de FA acima dos valores aceitáveis de exposição. Na Figura 3 estão descritos alguns dos efeitos possíveis da exposição a este composto, num crescente de concentrações que variam de 0.1 a 10 ppm.

De acordo com a duração e a concentração associada à exposição, esta pode ser classificada de diferentes formas. Assim pode ser de dois tipos: *exposição aguda*, quando o indivíduo está sujeito a uma exposição de curta duração mas em quantidades de composto muito elevadas, podendo ser do tipo accidental (quando não há intenção da mesma) ou intencional (quando estamos perante atos suicidas ou mesmo homicidas); e *exposição crónica*, quando o indivíduo está sujeito a uma exposição de longa duração mas em concentrações baixas, podendo esta ser do tipo ocupacional (quando estamos num contexto laboral) ou ambiental (Takeuchi, 2009).

Num cenário de exposição aguda por FA, os efeitos são geralmente transitórios e, em caso de inalação de vapores, incidem principalmente em irritação do trato respiratório e olhos mas também incluem fadiga, dificuldade de concentração, perda de memória, perturbações psicomotoras, alterações de humor. Em casos de ingestão da solução, podemos observar envenenamentos agudos (a sua severidade está diretamente relacionada com a quantidade de composto ingerida), irritação e queimaduras ao nível do trato digestivo, dor abdominal, vômitos e diarreia (Kim *et al.*, 2011). Em casos mais graves de intoxicação aguda, após ingestão deste composto são observados sérios danos ao nível do trato digestivo, que compreendem um quadro clínico que vai desde vômitos, irritação e constrição da garganta, vertigens, diarreia, convulsões, lesão renal, coma e morte (Almeida *et al.*, 2000). Quando há contacto direto com a solução e a pele pode provocar irritação severa.

No caso de exposição crónica, há um aumento da incidência de alterações de comportamento, no que respeita à motricidade, memória, percepção, cognição e estados de humor. Estando também reportados quadros de efeitos graves e crónicos, que compreendem faringites, rinites, desordens ao nível da córnea e letargia.

Uma das principais que se coloca na sensibilidade da percepção do odor e do irritação ocular é que com repetidas exposições ao longo do tempo, é a sua diminuição, devido à adaptação destes dois órgãos sensoriais. Isto pode levar assim a “exposição silenciosa” sem o trabalhador estar ciente de tal (OSHA, 2013).

Está também documentada em estudos experimentais em ratos com concentrações elevadas do composto, sintomatologia associada a inflamação, hiperplasia, alterações degenerativas, necrose ao nível do epitélio nasal e metaplasia escamosa (Appelman *et al.*, 1988; Monticello *et al.*, 1996).

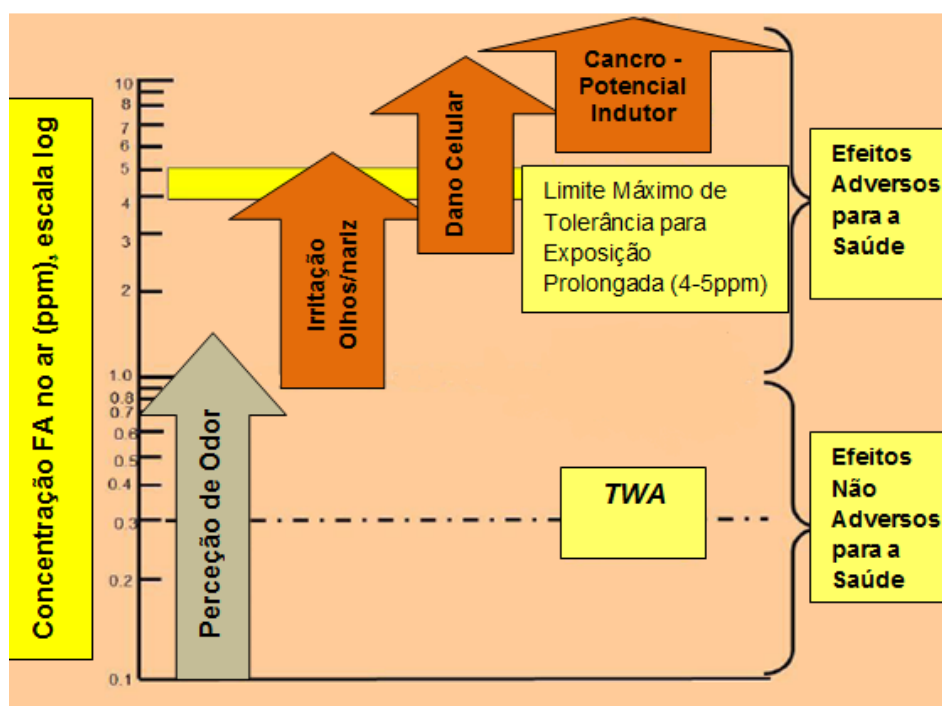


Figura 3- Concentração de FA no ar e efeitos na saúde (Policy and Research Division, 2009)

Diversos estudos reportam também a ocorrência direta de alergias ao nível dérmico. A frequência destes casos é superior nos Estados Unidos (entre 8 a 9%) em relação ao que sucede a nível europeu (entre 2 a 3%), o que em parte se pode dever a questões de legislação, dado que os valores aceitáveis de exposição são bastante diferentes, sendo mais elevados nos Estados Unidos em relação aos estabelecidos pelas organizações ao nível da Europa (Latorre *et al.*, 2011).

1.1.6. Efeitos genotóxicos e citotóxicos

O formaldeído (FA) é um composto genotóxico, estando documentadas evidências positivas em quase todos os indicadores genéticos da sua capacidade para alterar o ADN de diversos organismos, entre os quais, bactérias, leveduras, fungos, plantas, insetos, nemátodes e células de mamíferos em cultura. Os efeitos desta genotoxicidade têm sido seguidos muito de perto, desde a década de 80, pelas principais agências mundiais, como a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a Organização Mundial de Saúde (OMS), o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) e a *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) tendo surgido diversos relatórios acerca deste composto. Estes têm-se centrado principalmente na frequência de aberrações cromossómicas (AC), micronúcleos linfocitários (MN), micronúcleos bucais (MNB), micronúcleos bucais com pontes citoplasmáticas e trocas entre cromátídeos irmãos (SCE - *Sister Chromatid Exchanges*) de trabalhadores expostos ocupacionalmente a FA, sendo que a extensão do dano está diretamente relacionada com a concentração do composto e duração da exposição.

A formação de MN, MNB e pontes citoplasmáticas tem sido descrita em indivíduos expostos a FA, sendo a sua frequência superior relativamente a indivíduos controlo (Suruda *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 2005; Orsière *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008). Outra das questões abordadas é o aumento da frequência de AC em indivíduos expostos, documentado em diversos estudos (He *et al.*, 1998; Chinelato e Froes, 2002; Orsière *et al.*, 2006; Manikantan *et al.*, 2010) e também de SCE (He *et al.*, 1998; Shaham *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2005; S. Costa *et al.*, 2008). Mais recentemente tem sido também investigada em trabalhadores expostos a este composto, a formação de aductos de proteínas e de ADN, que alguns autores defendem ser um dos eventos chave no processo de carcinogénese química (Hedberg, 2001; Shaham *et al.*, 2002; NTP, 2011).

Nas últimas três décadas têm surgido diversos estudos acerca de dano genético potenciado por FA através de uma técnica moderna e inovadora, o teste do cometa ou *comet assay*. Na China, surgiu um estudo que incidiu sobre trabalhadores expostos a este químico, tendo estes apresentado níveis de dano genético elevados, utilizando o teste do cometa (Tang *et al.*, 2009). Num outro trabalho, Jiang *et al.* (2010) estudou o dano genético numa população de 151 trabalhadores expostos a FA e uma população controlo de 112 indivíduos sem historial de exposição, tendo determinado valores superiores de dano nos trabalhadores expostos relativamente aos controlos. No Brasil foi realizado um estudo em trabalhadores expostos a uma gama de químicos, principalmente tolueno, no qual foram encontradas diferenças significativas de aumento de dano genético por esta mesma técnica (Heuser *et al.*, 2007).

Outro ponto fulcral que tem sido alvo de diversos estudos é a influência da exposição ocupacional a FA na inativação de enzimas de reparação de dano genético. Hayes *et al.* (1997) estudaram este efeito por avaliação da atividade da *O⁶-Alkylguanine DNA alkyltransferase* (AGT), que se sabe estar envolvida em mecanismos específicos de reparação de dano no ADN provocado por agentes alquilantes *in vitro*. Este estudo foi levado a cabo em estudantes embalsamadores tendo sido feitas duas colheitas de sangue, uma antes de iniciarem a sua actividade curricular e outra após decorridas nove semanas do início da mesma; foram encontrados níveis mais reduzidos de reparação de ADN nos indivíduos aquando da segunda colheita realizada, devido à diminuição da actividade enzimática da AGT. Noutro estudo foi também testada a influência nos mecanismos de reparação específicos para lesões provocadas por FA. Por exposição de células DT 40 de galinhas, com mutações em vários genes envolvidos nos mecanismos de reparação ou checkpoints do ciclo celular, foi possível avaliar as diversas respostas ao dano provocado por exposição a FA, sendo a principal conclusão que a taxa de sobrevivência era muito inferior nas células mutantes em comparação com a das células *wild-type* (Ridpath *et al.*, 2007).

Foram também reportados estudos de hematotoxicidade que demonstram o efeito do FA ao nível das células sanguíneas, nomeadamente, na diminuição da concentração de linfócitos a nível global (Ye *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009) e dos restantes constituintes sanguíneos (Kuo *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2010). O FA, como referido anteriormente, está classificado como sendo carcinogénico para o ser humano, baseado numa larga gama de estudos realizados, que demonstraram uma associação entre exposição e risco de cancro, incidindo principalmente em trabalhadores industriais e trabalhadores de serviços de anatomia patológica (NTP, 2011). Os primeiros dados tornados públicos acerca dessa questão remontam a 1978, ano em que surgiram os primeiros resultados positivos do desenvolvimento de cancro nasal em ratos de laboratório, divulgados pelo *Chemical Industry Institute of Toxicology* (CIIT) (Mayan *et al.*, 1995). Inicialmente a classificação deste agente estava associada principalmente com o cancro nasofaríngeo (NPC) (Coggon *et al.*, 2003; Hauptmann, 2003). Posteriormente, com o desenvolvimento de outros estudos, obtiveram-se resultados que associaram a exposição ocupacional a FA com outros tipos de patologias oncológicas, nomeadamente, cancro nasais e paranasais (Holmstrom e Lund, 1991; Luce *et al.*, 2002). Mais recentemente surgiram dados que apoiam também a associação da exposição ocupacional a FA com o aumento de leucemias (Zhang *et al.*, 2010), mais concretamente de leucemias mielóides (Pinkerton, 2004; Beane Freeman *et al.*, 2009; Dreyfuss, 2010; NTP, 2011).

Em modelos animais, estão também documentados diversos estudos que levam às mesmas conclusões. Os resultados incidem principalmente em cancros ao nível da cavidade nasal (Monticello *et al.*, 1996) e nalguns casos também leucemias (IARC, 2012).

1.2. Avaliação da exposição

Com todas estas evidências no que respeita aos efeitos da exposição a formaldeído (FA) na saúde humana, fica demonstrada a necessidade de estimar os níveis de exposição (avaliação ambiental) e conhecer os potenciais efeitos que advêm dessa mesma exposição (avaliação biológica), de forma a prevenir eventuais danos para a saúde dos trabalhadores. A avaliação ambiental e a avaliação biológica constituem assim abordagens diferentes mas complementares para a avaliação da exposição a agentes químicos, assim como para a prevenção da mesma.

1.2.1. Avaliação ambiental

A monitorização ambiental corresponde a um conjunto de observações e medições de diversos parâmetros, de forma contínua ou repetida, através dos quais se procede à recolha de amostras do ar ambiente, para análise da concentração de poluentes químicos, com o objetivo de estimar a exposição e o risco para a saúde dos trabalhadores, por comparação dos resultados obtidos com um valor de referência, de modo a servirem de controlo ou forma de alarme em situações mais críticas.

As respetivas colheitas podem ser efetuadas num espaço físico comum, local de trabalho, ou então num espaço individual, correspondente a cada trabalhador, através da utilização de aparelhos portáteis. O tipo de amostragem que se efetua depende sobretudo da natureza das tarefas realizadas pelo trabalhador e da sua mobilidade no espaço geográfico de exposição ao agente que se pretende dosear.

Os valores máximos admissíveis (Valores Limite de Exposição, VLE; *Threshold Limit Values*, TLV; *Permissible exposure limit*, PEL; *Recommended Exposure Limit*, REL) representam, à luz do conhecimento científico actual, a maior concentração no ar de uma substância química a que a quase totalidade dos trabalhadores pode estar exposta, ao longo da jornada de trabalho, sem que daí resulte efeito adverso para a saúde (ACGIH, 2010). Os valores limite podem tomar duas formas (Prista e Uva, 2006):

- i. a *concentração média ponderada* (VLE-MP), durante os 5 dias de trabalho de uma semana de 40 horas, também designada como *time-weighted average* (TWA).
- ii. a *concentração máxima* (VLE-CM), definida como o valor que nunca deve ser excedido mesmo em curtos períodos de tempo, também identificada como *Ceiling* (limite de tecto). Inclui-se ainda neste âmbito, as concentrações médias ponderadas, por períodos de 15 minutos, que não devem ser ultrapassadas ao

longo de toda a jornada de trabalho (VLE-CD), também identificada como *Short-term Exposure Limit*, STEL.

No caso particular da exposição ao FA estão estabelecidos, pelas principais agências mundiais, os valores limite de exposição (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores limite de exposição ocupacional ao FA no ar (ppm) definidos pelas principais agências mundiais

Agências Mundiais	TWA ^a	STEL ^b	<i>Ceiling</i> ^c
OSHA	0.75 ppm ¹	2 ppm	
ACGIH			0.3 ppm
NIOSH	0.016 ppm ²		0.1 ppm

^a **TWA** (*time-weighted average*) – concentração média da substância química no ar, que não deve excedida durante uma jornada de trabalho de 8 horas¹/10 horas² e 40 horas semanais

^b **STEL** (*short-term exposure limit*) – concentração máxima da substância química no ar que não pode ser excedida durante 15 minutos ao longo do turno de trabalho

^c ***Ceiling*** (limite de teto) – concentração da substância química no ar que nunca deve ser excedida durante qualquer período de exposição, mesmo momentaneamente.

Com base em estudos realizados no que diz respeito à toxicidade deste agente químico, têm sido postos em causa estes valores e como consequência, têm sido realizadas diversas revisões dos mesmos pelas agências responsáveis, de modo a minimizar os danos, procedendo à diminuição dos valores anteriormente estabelecidos (Binetti *et al.*, 2006).

Em relação ao nosso país, a norma portuguesa atual, NP 1796 de 2007, recomenda como valor limite de exposição de concentração máxima (VLE-CM) 0.3 ppm, sendo este o valor máximo de concentração de FA no ar que nunca deve ser excedida durante qualquer período da exposição, sendo que acima dos valores limites de

exposição, estão associados sintomas de irritação ocular e do trato respiratório superior (IPQ, 2007).

1.2.2. Avaliação biológica

A avaliação biológica ou biomonitorização incide sobre o próprio indivíduo exposto, uma vez que consiste na quantificação da concentração do agente químico, seus metabolitos ou na análise de outros parâmetros resultantes da interação destes com o organismo.

Baseia-se em testes que visam o doseamento dos agentes químicos ou metabolitos resultantes em meios biológicos (sangue, urina, fezes e outros) e em testes direcionados para a detecção e possível quantificação de alterações biológicas resultantes da resposta do organismo ao agente químico ao qual está exposto (Prista e Uva, 2006).

Visa, portanto, avaliar o risco resultante da exposição, não pela presença do agente químico no meio ambiente, em maior ou menor concentração, mas em função da quantidade que efetivamente penetrou no organismo. Utiliza como parâmetros de estudo indicadores biológicos ou biomarcadores, designados como “toda a substância, estrutura ou processo que pode ser quantificado no organismo ou nos seus meios biológicos e que influencia ou prediz a incidência de um acontecimento ou de uma doença” (IPCS, 2000).

A biomonitorização apresenta vantagens em relação à monitorização ambiental, dado que se relacionam mais diretamente com os efeitos adversos e têm em consideração todas as vias de exposição possíveis (oral, inalação e cutânea). Além disso tem também em conta as possíveis variações que advêm da suscetibilidade individual, ou seja, diferenças na absorção, metabolismo, distribuição e excreção dos químicos.

No entanto, a biomonitorização apresenta também algumas limitações, nomeadamente, a não existência de um indicador biológico válido para a maior parte das substâncias químicas e o facto de que o material de análise não ser, regra geral, o órgão crítico (Pivetta *et al.*, 2001).

A avaliação biológica e a avaliação ambiental são também duas componentes de vigilância essenciais e complementares, sendo partes integrantes de uma avaliação fundamental que tem como principal objetivo assegurar o bem-estar humano. A Figura 4 apresenta de forma esquemática a complementaridade entre os dois tipos de avaliação.

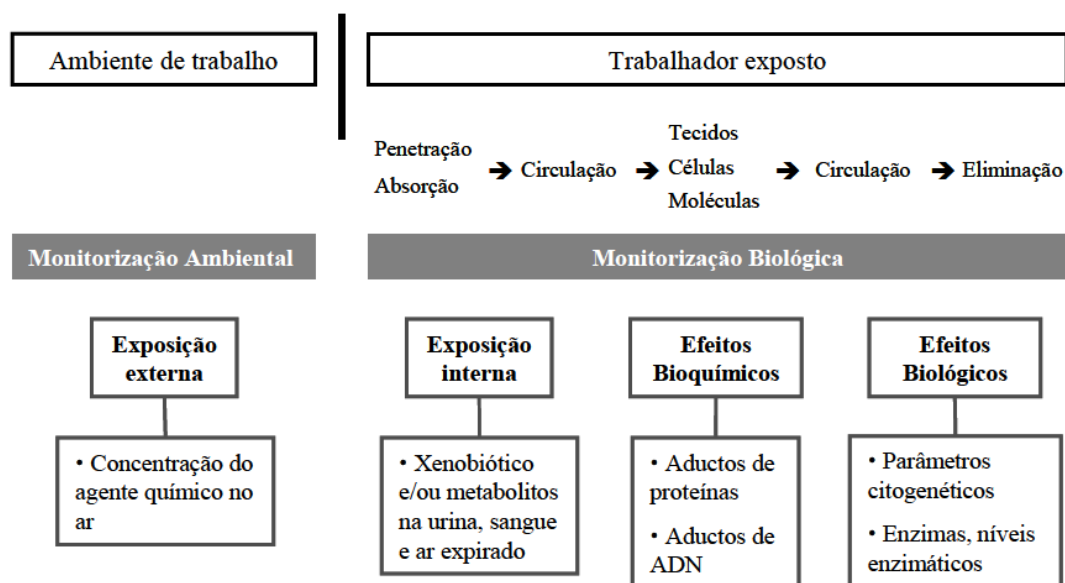


Figura 4 - Monitorização Ambiental e Monitorização Biológica (Adaptado de (Amorim, 2003) e (Prista e Uva, 2006))

Biomarcadores

Os biomarcadores (Figura 5) ou indicadores biológicos podem ser um químico, um dos seus metabolitos ou o produto de uma interação entre o químico e uma molécula alvo, que é medido em diferentes fluidos humanos. São utilizados para avaliação de índices de exposição e no estabelecimento de limites para a mesma, uma vez que são intermediários entre a exposição e a manifestação clínica da doença, não sendo, no entanto, a sua deteção obrigatoriamente sinónimo de doença ou de um processo tóxico, podendo apenas significar exposição do organismo a uma determinada substância ou conjunto de substâncias. Estes permitem-nos ter uma ideia acerca dos efeitos de uma exposição a determinado composto e como o organismo pode responder à mesma, pois são índices altamente sensíveis de exposição individual a agentes químicos, abrangendo todas as vias de exposição e integrando uma grande variedade de fontes de exposição (IPCS, 2000). São indicadores de uma cadeia de eventos que pode culminar num estado de doença, podendo representar um estágio precoce da mesma (por exemplo as aberrações cromossómicas (AC)) ou um estágio mais tardio. No entanto, tal como, a palavra indica, são *indicadores*, o que não implica que a sua presença por si só seja sinal do desenrolar do processo final de doença. Para isso é necessário o desenvolvimento de

uma série de acontecimentos e a intervenção de vários fatores, dependendo principalmente da suscetibilidade individual (Amorim, 2003).

São uma ferramenta muito poderosa, dado que, para além de confirmarem a absorção do composto pelo organismo e consequente exposição, e, dependendo do método utilizado para a sua avaliação, são detetáveis em concentrações muito baixas, e, em casos particulares de doenças progressivas, podem ser essenciais pelo fato dos sintomas da doença só se manifestarem muito tempo depois da exposição propriamente dita (Gil e Pla, 2001). Promovem assim uma ajuda preciosa na avaliação da exposição e na intervenção que poderá ser efetuada ao nível de saúde pública.

As células mais frequentemente utilizadas em estudos de monitorização de populações são os linfócitos. Isto deve-se à sua fácil e rápida colheita, isolamento, elevada quantidade no sangue humano (1200 a 1300 por μl de sangue), resistência após exposição a citotóxicos e o seu tempo de vida que pode variar de um e meio a dez anos (Bogen, 1993). São uma referência neste campo pois constituem uma forma precoce de indicação de efeitos adversos para a saúde, como resultado de uma exposição a agentes carcinogénicos e genotóxicos conhecidos ou substâncias possivelmente suspeitas (Albertini *et al.*, 2000).

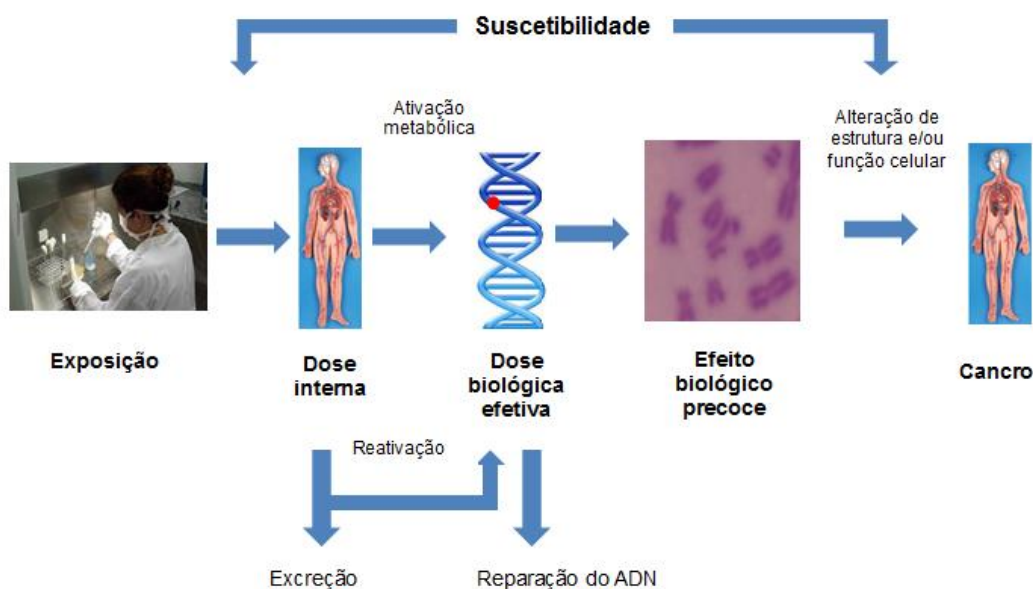


Figura 5 – Biomarcadores de dose, efeito e suscetibilidade (adaptado de (Costa, 2008))

Biomarcadores de exposição

São compostos exógenos, seus metabolitos ou o produto da interação entre o composto e uma molécula alvo ou célula, que é medido num tecido ou fluido corporal do organismo. Pode representar a quantidade total absorvida, a quantidade que atinge determinado tecido ou célula, a quantidade que se liga às moléculas-alvo. Para isto é necessário ter-se um conhecimento prévio profundo acerca da toxicocinética do agente químico em questão, de modo a realizar uma correta interpretação dos resultados obtidos. Estes indicadores dão-nos uma ideia acerca da concentração da substância a que o organismo esteve exposto, o que permite depois fazer uma estimativa do risco para a saúde, pelo conhecimento prévio da relação dose-efeito (Prista e Uva, 2006).

Aqui incluem-se, por exemplo, o ácido fórmico na urina como indicador de exposição a formaldeído, o ácido δ -aminolevulínico (ALA) na urina como indicador de exposição a chumbo, o chumbo no sangue como indicador de exposição a chumbo, e o ácido metilhipúrico na urina como indicador de exposição a xileno.

Biomarcadores de efeito

São indicadores de alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais, resultantes da interação entre o químico e/ou seu metabolito com o organismo. Refletem modificações precoces, reversíveis ou não, que precedem danos estruturais ou funcionais progressivos a nível molecular, celular e tecidual (Amorim, 2003).

Podem ser aplicados em contexto preventivo, utilizando parâmetros que indiquem uma fase precoce e reversível do estado de saúde, ou em contexto mais tardio, quando já são visíveis estádios de doença. Representam já o início da cadeia de acontecimentos que decorreu da interação do agente químico com o organismo alvo, dando uma ideia dos danos provocados no organismo.

Alguns dos biomarcadores de efeito mais utilizados para avaliar a exposição a substâncias potencialmente carcinogénicas e mutagénicas são as aberrações cromossómicas (AC), a formação de micronúcleos (MN) e as trocas de cromátídeos irmãos (SCE). O papel destes indicadores como preditores de possíveis efeitos nocivos resultantes da ação de um genotóxico está extensamente documentado na literatura. O teste do cometa é uma técnica inovadora de deteção de dano genético a nível do ADN que tem vindo a ser muito utilizada em estudos de biomonitorização. Este método tem aumentado a sua importância ao nível da avaliação da exposição ocupacional, dado que,

recentemente, foi também demonstrada a capacidade do FA em induzir um aumento do dano no ADN em linfócitos de trabalhadores expostos a este aldeído no seu local de trabalho (Yu *et al.*, 2005).

Biomarcadores de suscetibilidade

Os biomarcadores de suscetibilidade são indicadores da capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao estímulo provocado pela exposição a um xenobiótico específico. Destacam diferenças individuais e/ou populacionais pré-existent e independentes da exposição. Estas diferenças são predominantemente de origem genética (polimorfismos genéticos), embora a ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação e a exposição concomitante a outros agentes ambientais possam influenciar a suscetibilidade individual a um agente externo (Prista e Uva, 2006). Estes biomarcadores dão-nos assim a indicação do risco individual, por influência de diversos fatores intrínsecos, no desenvolvimento de uma resposta a uma exposição a agentes químicos (Amorim, 2003).

Aberrações cromossômicas (AC)

As AC são alterações estruturais ou numéricas que ocorrem ao nível dos cromossomas, por ação de químicos ou radiações e que podem resultar de vários mecanismos, como por exemplo, dano direto na cadeia de ADN, inibição da síntese de ADN e replicação de uma cadeia de ADN danificada. Têm como ponto de partida uma quebra dupla na cadeia de ADN o que normalmente desencadeia o início de um mecanismo de reparação, de modo a restaurar o normal funcionamento e estrutura. São *“a parte microscopicamente visível de uma gama de alterações do ADN, geradas por diferentes mecanismos de reparação de DSB (Double Strand Break)”*. Os locais da sua formação situam-se principalmente na cromatina ativa (estrutura mais facilmente acessível) e nas regiões sub-teloméricas (Obe *et al.*, 2002).

Podem-se classificar em diferentes tipos e como exemplos destas alterações temos gaps, quebras, anéis, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos, figuras homólogas e figuras radiais e *interchanges*. Esta técnica consiste na observação de células em metafase, onde é possível a visualização dos cromossomas na sua condensação máxima, e contagem da totalidade dos cromossomas (46 ± 1), com especial atenção a possíveis eventos considerados “anormais” em cada cromossoma. Esta é uma técnica validada e que tem sido amplamente utilizada em estudos de biomonitorização humana, visto que, existe uma forte evidência de que níveis elevados estão associados ao aumento do risco de cancro (Bonassi *et al.*, 2008).

As AC têm sido utilizadas ao longo dos últimos 30 anos em contexto tanto ocupacional como ambiental, como biomarcadores de efeito precoce de carcinogénios genotóxicos. Atualmente são utilizadas de modo rotineiro para avaliação da genotoxicidade *in vitro* (em linfócitos humanos e linhas celulares) e *in vivo* (na medula óssea de roedores) (Hagmar, 2004).

Tipos de aberrações cromossômicas (AC)

As AC podem-se dividir em dois tipos, dependendo se afetam o número de cromossomas, 46, (numéricas) ou a estrutura dos mesmos (estruturais). A classificação destas últimas depende ainda da etapa do ciclo celular em que são geradas.

Sendo assim, as AC numéricas correspondem a uma alteração no número normal de cromossomas (por perda ou ganho), podendo resultar da má segregação dos mesmos, o que pode originar um processo espontâneo ou por consequência de um tratamento com um aneugénico (Mateuca *et al.*, 2006). Podemos ter assim as **Aneuploidias** que podem corresponder a um genótipo de 45 cromossomas ou de 47 (Albertini *et al.*, 2000).

Em relação às estruturais, podemos ter **AC do tipo cromatídico** (compreendem os gaps, as quebras e as figuras homólogas e figuras radiais); e **AC do tipo cromossómico** (compreendem os gaps duplos, as quebras duplas, os anéis e os cromossomas dicêntricos) (Savage, 1975). Sabe-se também que estes dois tipos de AC se formam em diferentes fases do ciclo celular. Assim, as AC do tipo cromatídico originam-se nas Fases S/G₂ e as do tipo cromossómico originam-se nas Fases G₀/G₁ do ciclo celular (Albertini *et al.*, 2000). As AC que afetam a estrutura do cromossoma propriamente dita, resultam de rearranjos sofridos por erros ocorridos no processo normal de recombinação (*crossing-over*) que, numa situação normal, asseguram a variabilidade genética (Mateuca *et al.*, 2006).

Os **gaps** (Figura 13) são pequenas regiões alinhadas não coradas nos cromossomas ou nos cromatídeos (sendo estes últimos as mais frequentes) que podem ter diferentes posições e aspetos, variando desde pequenas regiões quase impercetíveis até regiões mais nítidas de descontinuidade delimitadas (Savage, 1975). Este tipo de AC é menosprezado pela maioria dos autores, mas existem outros que os consideram como um fenómeno precedente de uma quebra e pode, corresponder a um dano recente no material genético (Lander *et al.*, 2000; Paz-y-Miño *et al.*, 2002).

Uma **quebra** (Figura 14) corresponde a uma descontinuidade num cromatídeo ou num cromossoma que pode dar origem a um fragmento acêntrico, neste último caso, sendo que geralmente não se encontra no mesmo alinhamento do cromossoma. Semelhante às quebras pode ocorrer outro tipo de AC designado por **minutos**, que surgem por lesão e posterior remoção das extremidades de dois braços do cromossoma por uma lesão (Savage, 1975).

Os **anéis** (Figura 15) resultam de lesões em locais opostos dos cromátídeos de um único cromossoma, com formação de um fragmento acêntrico, (por quebra das extremidades) que por vezes se pode perder durante a divisão celular. As duas lesões são colocadas num plano proximal por um loop que contém o centrómero e daí resulta a estrutura circular (Savage, 1975). São fenómenos pouco comuns, mas que podem ocorrer em qualquer um dos cromossomas.

Os **cromossomas dicêntricos** (Figura 16) resultam de lesões ocorridas nos braços de diferentes cromossomas, homólogos ou não homólogos, que resultam num único cromossoma com dois centrómeros, acompanhado por um fragmento acêntrico, que por vezes se perde no meio do processo (cerca de 40-50% dos casos) tendo sido formado a partir das porções terminais dos cromossomas envolvidos. Em casos extremos pode ocorrer a formação de cromossomas policêntricos, sendo compostos por mais que dois centrómeros (Savage, 1975).

As **Figuras Homólogas** (Figura 17) e as **Figuras Radiais** (Figura 18) têm a mesma origem de formação, diferindo apenas na natureza dos cromossomas intervenientes, se homólogos ou não homólogos, respetivamente. Assim, formam-se por consequência de duas lesões em cromátídeos de diferentes cromossomas, seguido de uma troca de material genético entre os mesmos, resultando uma figura simétrica ou assimétrica. Ocasionalmente ocorrem também outro tipo de figuras, as **Interchanges** (Figura 19) que têm a mesma origem de formação, diferindo apenas no fato de os cromossomas se rearranjarem em forma de X e não em forma de U (Savage, 1975).

Algumas aberrações cromossómicas são estáveis, sendo por isso capazes de passar inalteradas ao longo de diversas divisões celulares mitóticas e meióticas, enquanto outras são instáveis mas muito mais raras que as primeiras (anéis, cromossomas dicêntricos), podendo, na sua presença comprometer o destino da própria célula. A estabilidade cromossómica é definida assim pela presença de um centrómero funcional e dois telómeros intactos (Natarajan, 2002).

As AC são biomarcadores validados da existência de risco acrescido de cancro (Stefano Bonassi et al., 1995; Natarajan, 2002). Há evidência de que muitos tipos de cancros humanos estão associados a aberrações cromossómicas de tipo específico ou não (Carrano e Natarajan, 1988), existindo uma correlação positiva entre a frequência de AC e o risco de ocorrência futura de cancro (Lars Hagmar *et al.*, 1998; Boffetta *et al.*, 2006).

Trocas entre cromátídeos irmãos (SCE - *Sister Chromatid Exchanges*)

As trocas entre cromátídeos irmãos (SCE) são translocações recíprocas de material genético entre as duas cadeias de ADN de ambos os cromátídeos de um mesmo cromossoma (Figura 6). A técnica utilizada para a identificação de SCE é semelhante à das AC, diferindo apenas no fato de nas SCE haver uma diferenciação dos dois cromátídeos, sendo esta obtida em células que incorporam 5-bromodeoxiuridina (BrdU), análogo da timina, em dois ciclos de replicação consecutivos (Figura 7). Durante estes ciclos não há tempo para que ocorra reparação do ADN que foi lesado (quebrado) *in vivo* (Rooney e Czepulkowski, 1996). A adição, na fase da coloração da técnica, do fluorocromo Hoescht, torna visível a distinção das duas cadeias, uma vez que apenas a cadeia que tem a BrdU incorporado adquire fluorescência. Sabe-se que as SCE são induzidas por substâncias que formam adutos de ADN ou que interferem com o processo de reparação de ADN (Carrano e Natarajan, 1988). Vários estudos *in vitro* demonstraram um aumento na frequência de SCE em células de animais e de populações humanas, expostos a agentes reconhecidamente mutagénios e carcinogénios (Carrano e Natarajan, 1988), por isso, este é um teste útil para monitorizar a exposição a este tipo de compostos.

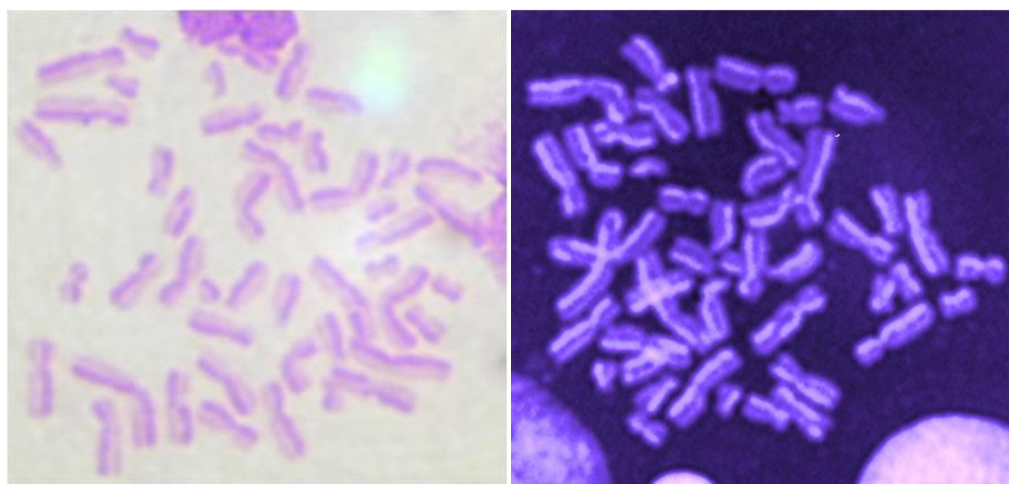


Figura 6 - SCE observada em linfócitos em metafase (1250X) (primeira fotografia apresenta as cores reais e a segunda sofreu tratamento para aumentar a distinção das cores) (Costa *et al.*, 2008)

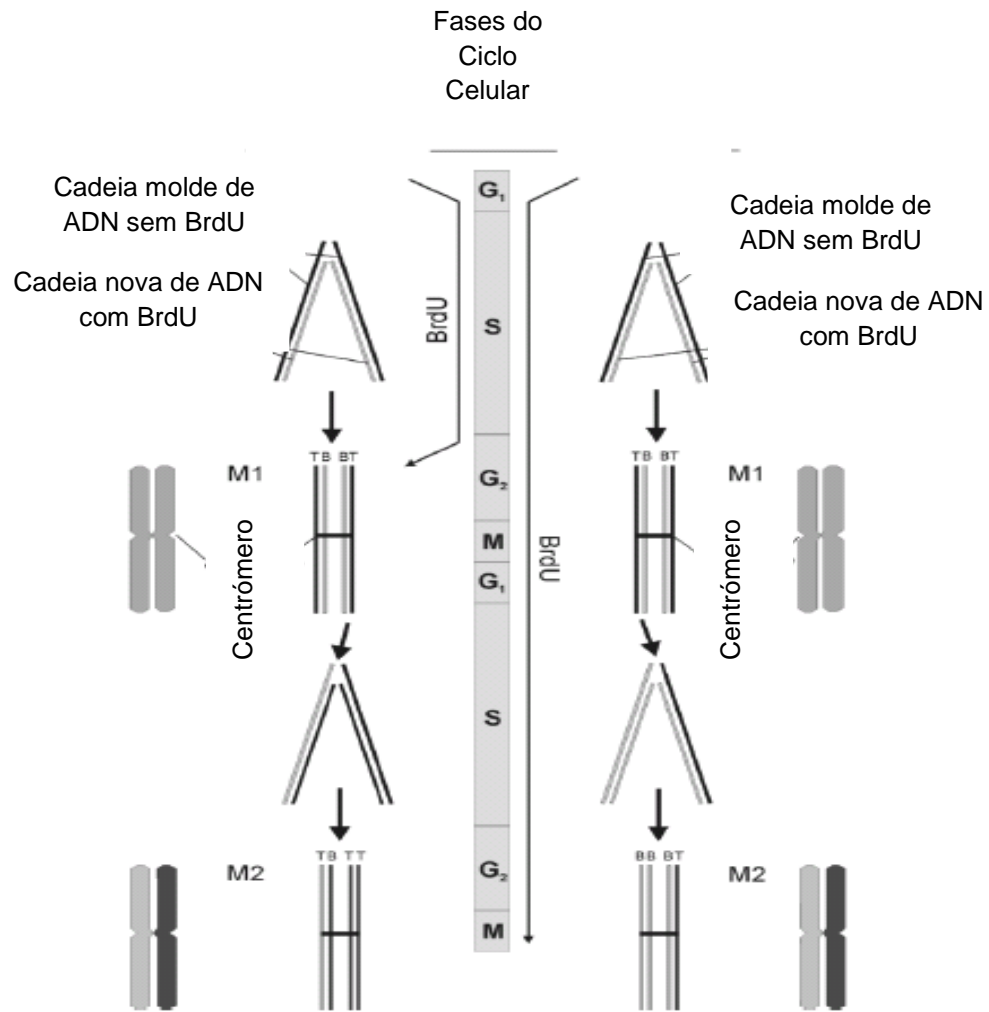


Figura 7 - Diagrama explicativo do mecanismo de replicação das cadeias de ADN depois de incorporarem BrdU (Wojcik, 2007)

Micronúcleos (MN)

Os micronúcleos (Figura 8) são pequenos corpos extranucleares revestidos de membrana que resultam de um evento ocorrido durante a divisão celular, mais especificamente durante a fase de anafase (Mateuca *et al.*, 2006). Podem-se formar quando um cromossoma ou um fragmento acêntrico, por algum erro que ocorreu no aparelho do fuso acromático, nos centrômeros, alteração na condensação cromossômica, dano nos cromossomas, disrupção mecânica ou hipometilação do ADN centromérico, demora mais tempo a ser segregado que o resto do material genético, não ficando incluído nos núcleos das células filhas, na fase de telofase. O que acontece é que, à semelhança dos núcleos principais, este material genético também é envolvido por membrana nuclear, dando origem a um MN, com uma estrutura tipicamente arredondada e com morfologia igual à dos núcleos principais mas apenas com um tamanho inferior, característica a partir da qual recebem a sua designação (Fenech, 2000). Este teste consiste na observação de células em interfase onde são detetados MN resultantes de danos genéticos induzidos por agentes tóxicos. O MN é um biomarcador muito importante em estudos de biomonitorização humana, tendo sido largamente utilizado no estudo de populações expostas a substâncias genotóxicas (Fenech, 1993).

Este é um teste validado como indicador de efeito precoce de risco de cancro uma vez que se observou em populações humanas que a frequência de MN correlaciona-se positivamente com o risco de desenvolvimento da patologia oncológica (Bonassi *et al.*, 2007) e é extensamente utilizado em testes de avaliação de dano genético em estudos de epidemiológicos (Fenech, 1993).

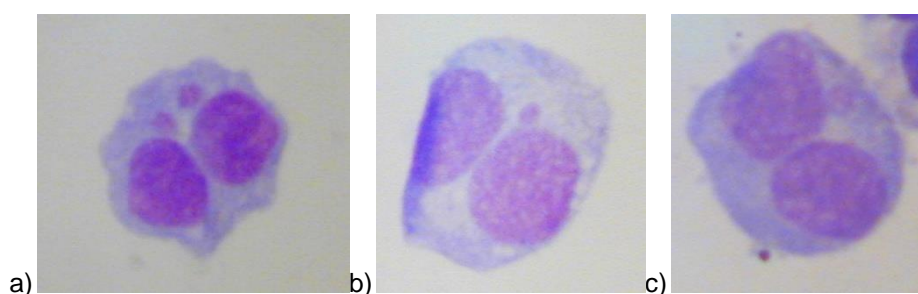


Figura 8 - Micronúcleos observado em células binucleadas (1250X) (a.célula binucleada com dois micronúcleos; b), c) células binucleadas com um micronúcleo (Costa *et al.*, 2008)

Teste do cometa ou *comet assay*

As técnicas anteriormente referidas são técnicas de citogenética clássica, mas nas últimas décadas, surgiu uma técnica inovadora de detecção de dano genético a nível do ADN em células individualizadas, o teste do cometa ou *comet assay* (também designado por *single cell gel eletrophoresis*).

Esta é uma técnica rápida, simples, sensível e versátil que permite detetar danos no ADN em células eucarióticas (Fairbairn *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1999; Collins, 2004) resultantes da exposição a genotóxicos e que tem vindo a ser extensamente utilizada em estudos de biomonitorização humana (Kassie, 2000). Foi pela primeira vez introduzida por Östling e Johanson em 1984, como um método microeletroforético de visualização direta de dano no ADN em células individuais. As imagens obtidas, dada a sua forma, foram designadas “cometas” e eram medidos de modo a determinar a extensão de dano genético. Em 1988, surgiu uma versão alcalina da técnica, apresentada por Singh e seus colegas (Olive *et al.*, 1990). Ao longo dos últimos anos têm surgido diversas variações deste método, com alterações ao nível do pH, coloração, e análise de diversos parâmetros dos cometas (Fairbairn *et al.*, 1995). Estas variantes compreendem, entre as mais comuns, a *versão alcalina* (caudas dos cometas mais definidas e pronunciadas), a *versão neutral* (diminui a sensibilidade da técnica mas aumenta a gama de aplicações da técnica) e a *versão modificada com recurso a enzimas específicas* de locais de lesão (de modo a identificar tipos específicos de dano genético) (Collins, 2004).

Sucintamente, a técnica consiste na lise de células que foram previamente suspensas num gel de agarose (agarose de baixo ponto de fusão, LMP – *low melting point*) e colocadas sobre lâminas que continham previamente uma camada de gel de agarose (agarose de ponto de fusão normal, NMP – *Normal Melting Point*). Durante a electroforese, o ADN danificado migra dando a aparência de uma cauda, pois há um relaxamento (*unwinding*) das cadeias, ficando as quebras livres para migrar ao longo do campo elétrico ao qual estão submetidas. As lâminas são depois lavadas e procede-se à coloração recorrendo a um corante fluorescente de ligação ao ADN, para a análise das imagens por microscopia de fluorescência (Fairbairn, 1995). O nome do teste deve-se ao facto das células com ADN danificado terem um aspeto similar a um cometa com a cabeça intensamente brilhante e uma cauda cujo comprimento e intensidade se relaciona com o dano; as células não danificadas apresentam-se sem cauda, tal como pode ser observado na Figura 9.

Esta técnica permite a detecção de vários tipos de dano no ADN de células individuais, nomeadamente: quebras na cadeia do ADN, simples ou dupla, ligações cruzadas do tipo ADN-proteína, regiões alcali-lábeis [regiões no ADN que sofreram

adição de grupos alquila (metil ou etil) e que podem levar a alterações no emparelhamento de bases e a perdas de bases; e quando são sujeitas a condições de pH elevado, estas regiões resultam na separação da cadeia polinucleotídica (Maluf, 2004)] e *incomplete excision repair sites* [locais no ADN onde o processo de reparação por excisão ficou incompleto (Collins, 2004)]. O dano avaliado pelo teste do cometa pode ser analisado por avaliação visual com categorização do dano em 4 classes ou avaliação automática recorrendo a *software* específico. Neste último caso, os parâmetros mais utilizados para avaliar o dano são o comprimento da cauda do cometa (TL), a percentagem (%) de ADN na cauda e o *Olive tail moment*, (Faust *et al.*, 2004; Kumaravel e Jha, 2006). O TL, ou *tail length*, está diretamente relacionado com o tamanho dos fragmentos de ADN e com o tamanho da cauda do cometa. A percentagem de ADN na cauda (%TADN) expressa a percentagem de material genético que migrou. O *Olive tail moment*, originalmente definido por Olive *et al.* (1990), é o produto entre a percentagem de ADN na cauda e a distância média de migração (distância entre os centros de gravidade da cabeça e da cauda) (Kumaravel e Jha, 2006).

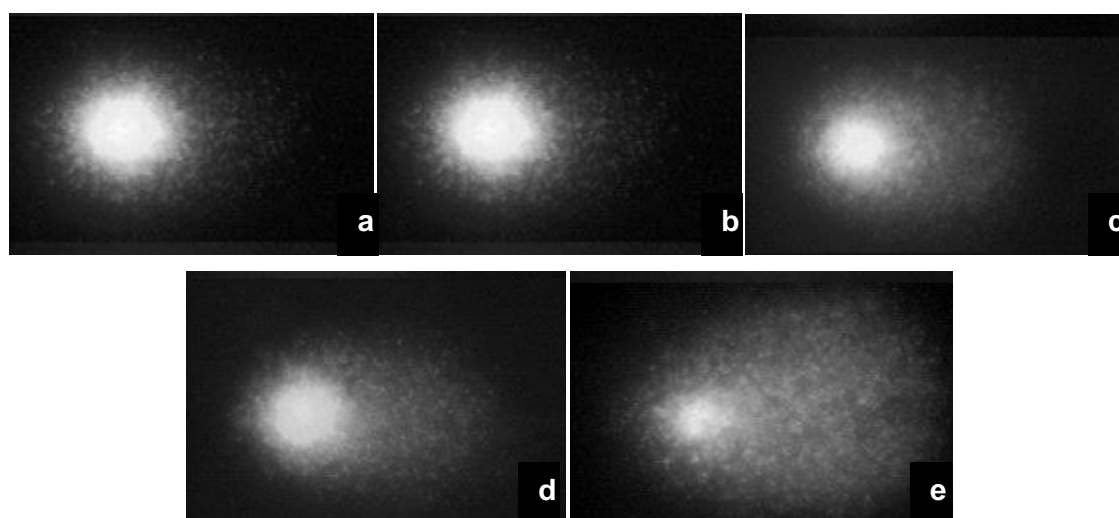


Figura 9 - Imagens de células obtidas pelo teste do cometa (a, b, c, d, e, diferentes graus de dano observados) (Costa, 2008)

A sensibilidade e especificidade da técnica pode ser potenciada se forem incubadas as moléculas de ADN com endonucleases bacterianas de reparação que reconhecem locais específicos de dano no ADN e convertem lesões em DSB, aumentando a quantidade de ADN na cauda do cometa (Kumaravel *et al.*, 2007).

Esta técnica é maioritariamente utilizada em células animais (em cultura ou isoladas do organismo, por exemplo, linfócitos), no entanto foram desenvolvidas novas variantes, de modo a que esta técnica possa ser aplicada a outros tipos de células, como as vegetais.

As principais aplicações desta técnica estão direcionadas para novos químicos no que respeita às suas propriedades genotóxicas, monitorização de contaminação ambiental por substâncias genotóxicas, biomonitorização ocupacional humana de exposição a químicos ou radiações, estudos nutricionais, relacionados com os efeitos que nutrientes e micronutrientes possam desencadear ao nível de dano genético em humanos, epidemiologia molecular e investigação fundamental de diagnósticos em dano e reparação de ADN (Collins, 2004).

1.3. Objetivo do trabalho

O objetivo deste estudo foi avaliar o dano genético em trabalhadores potencialmente expostos a formaldeído (FA) em laboratórios de anatomia patológica. Para o efeito foram definidas as seguintes tarefas:

- Avaliar a exposição ocupacional a FA através da determinação dos níveis de FA no local de trabalho;
- Analisar a frequência de diferentes tipos de aberrações cromossômicas (AC) e dano genético (teste do cometa) como biomarcadores de efeito;
- Compreender a possível influência de fatores individuais como a idade, género e hábitos tabágicos nos resultados obtidos.

2. Material e Métodos

2.1. População estudada

O presente estudo foi desenvolvido tendo por alvo os profissionais dos Serviços de anatomia patológica de hospitais do Sistema Nacional de Saúde dos distritos do Porto e Aveiro. Paralelamente foi selecionada uma população controlo com características demográficas, de idade, sexo, estilos de vida e hábitos tabágicos, semelhantes ao grupo exposto, com historial ocupacional de não exposição a este agente químico, sendo constituída por trabalhadores do setor terciário na área da Educação e dos Sistemas Multimédia.

2.1.1. Contato com as instituições

Após a identificação das unidades hospitalares com serviços de anatomia patológica, das regiões acima mencionadas, procedeu-se ao contato com os responsáveis destes serviços. O primeiro contacto, feito por carta, foi acompanhado por uma breve descrição do projeto e teve por objetivo dar a conhecer o estudo, pedir a colaboração dos profissionais do serviço e obter autorização por parte da respetiva direção para a realização do mesmo. Num segundo contacto, presencial, pretendeu-se contactar diretamente os trabalhadores destes serviços com o objetivo de esclarecer quaisquer dúvidas acerca do estudo e da natureza da participação requerida. O mesmo procedimento foi adotado no contacto com a população controlo.

O estudo foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975 e revista em 1989.

Todos os indivíduos que aceitaram participar no estudo foram informados dos objetivos do trabalho em curso e, uma vez manifestado o seu consentimento por escrito (Anexo II), responderam a um questionário, preenchido durante uma entrevista (Anexo III), para recolha de dados demográficos e sociais e outros potenciais fatores de risco associados à exposição a compostos reconhecidos como cancerígenos (hábitos tabágicos, Raios X, entre outros). Os indivíduos expostos responderam ainda a questões relacionadas com a sua atividade laboral, uso de equipamento de proteção individual, anos de atividade profissional, entre outros.

Para este estudo tivemos em conta diversos fatores. No que respeita aos hábitos tabágicos, foram considerados não fumadores indivíduos que nunca tivessem fumado ou

que já não fumassem há mais de um ano e fumadores os que fumassem há mais de um ano. No que diz respeito ao consumo de álcool todos os inquiridos indicaram que o faziam apenas socialmente, sem exceções. Relativamente ao grupo exposto consideraram-se apenas trabalhadores que exercessem as suas funções há pelo menos 12 meses.

2.2. Metodologia

Procedeu-se à monitorização ambiental para avaliar a exposição de cada profissional a formaldeído (FA) e à monitorização biológica para análise do efeito genotóxico dessa mesma exposição. As metodologias abaixo descritas encontram-se otimizadas pela instituição de acolhimento.

2.2.1. Avaliação ambiental

A exposição dos profissionais dos serviços de anatomia patológica a formaldeído (FA) ocorre principalmente durante o exame macroscópico das peças cirúrgicas conservadas em formol (registo das peças) e no despejo desse mesmo formol aquando da eliminação das peças para posterior tratamento como resíduos hospitalares (despejo e lavagem das peças) (Mayan *et al.*, 1995; Orsière *et al.*, 2006; Viegas *et al.*, 2010). A monitorização ambiental foi realizada no decorrer destas duas tarefas e em outros pontos relevantes dos locais de trabalho para a estimativa da concentração média ponderada (TWA).

A quantificação de FA no ambiente ocupacional, representativa do ar inalado pelos profissionais durante a sua atividade laboral, foi efetuada por colheita de ar no posto de trabalho, e posterior doseamento do agente químico no laboratório.

A colheita de ar foi efetuada em frascos lavadores (ou *impingers*) contendo 10 ml de bissulfito de sódio a 1%, associados a bombas de colheita de ar, previamente calibradas, com fluxo médio de aspiração regulado para 1l/minuto (Figura 10).



Figura 10 – Coletor de Ar

Em cada posto de trabalho foram colocados dois coletores de ar, ao nível das vias respiratórias do trabalhador, durante períodos representativos do processo normal de trabalho (cada amostragem foi realizada por períodos máximos de 60 minutos). A disposição dos coletores é estrategicamente localizada, de forma a não perturbar a rotina normal de trabalho dos profissionais, e obter uma melhor caracterização da exposição do trabalhador. No momento da colheita de ar foi pedido ao trabalhador que respondesse a questões sobre a sua rotina de trabalho, nomeadamente, o tipo de tarefas que desenvolve naquele posto de trabalho e o número de horas despendido para cada tarefa.

O procedimento para a quantificação de FA no ar é adaptado do método descrito pelo *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 1994), método nº 3500, no qual se recorre à técnica de Espectrofotometria UV/Visível. Neste método o FA, num meio de ácido sulfúrico concentrado, reage com o ácido cromotrópico e produz um complexo que tem o seu máximo de absorção a 580 nm.

A tubos de ensaio, devidamente identificados (amostras, branco e padrões de leitura), adicionou-se 0.1 ml de ácido cromotrópico a 1%, que foram posteriormente homogeneizados. Já na hotte, foram adicionados, 6 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada um dos tubos. Após mistura, os tubos foram colocados num banho-maria a 90°C durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura das absorvâncias dos padrões e das amostras no espectrofotómetro UV/VIS ATI UNICAM, a 580 nm. O limite de quantificação do método utilizado é de 0.06 ppm.

O valor de médio de exposição ao FA (TWA), obtido para cada trabalhador para jornadas diárias de trabalho de 8 horas, foi calculado matematicamente de acordo com a expressão representada na Figura 11. Cada produto, $C_n \times T_n$, representa uma tarefa, sendo C_n a concentração de FA no ar (ppm) obtida durante a realização da tarefa e, T_n o tempo, em horas, que o trabalhador despende na sua jornada de trabalho para a realização daquela tarefa.

$$TWA (8 \text{ horas}) = \frac{C1 \times T1 + C2 \times T2 + Cn \times Tn}{8 \text{ horas}}$$

Figura 11 - Cálculo do valor de TWA para cada trabalhador numa jornada diária de trabalho de 8 horas; C representa a concentração de FA no ar (em ppm) obtida durante a realização da tarefa e T representa o tempo de duração da tarefa (em horas)

2.2.2. Avaliação biológica

1. Recolha de amostras biológicas e informação relevante

A cada indivíduo participante foi colhida uma amostra de 10ml de sangue para o doseamento dos biomarcadores de genotoxicidade. A colheita de sangue, para ambas as técnicas, foi feita em tubos com heparina sódica.

Todas as amostras foram codificadas e mantidas a 4°C até chegarem ao laboratório para posterior processamento.

2. Análises citogenéticas

Teste das aberrações cromossómicas (AC)

Em tubos previamente identificados adicionaram-se alíquotas de 0,5 ml de sangue total a 4.5 ml de meio de cultura (F-10 HAM suplementado com mistura de antibióticos, heparina sódica injetável, L-glutamina e *Fetal Bovine Serum*, FBS). Também foram adicionados 80 µl de fitohemaglutinina reconstituída a 2% em água desionizada para estimular a divisão dos linfócitos. As culturas foram depois colocadas a incubar numa estufa a 37°C. Para cada amostra preparam-se duas réplicas de cultura de células. Até à finalização da incubação todos os passos foram realizados em condições de assepsia, numa câmara de fluxo laminar e utilizando sempre material esterilizado.

O teste das AC baseou-se no método descrito por (Gil, 2000), com algumas modificações.

Às 48 horas de incubação foram adicionados 55 µl de colcemida (0.11 µg/ml), de modo a parar o ciclo celular em metafase (estádio do ciclo celular de maior condensação da cromatina, sendo possível a visualização dos cromossomas) e colocou-se novamente a incubar até perfazer as 51 horas, após o que as células foram separadas por centrifugação a 1000 rpm (270g) durante 10 minutos. A partir deste passo deixou de ser necessário trabalhar em condições de assepsia.

Desprezou-se o sobrenadante e verteu-se com cuidado até obter a menor quantidade de líquido possível. Realizou-se o choque osmótico com 8 ml de KCl 0,075M, a 37°C durante 5 minutos, borbulhou-se cada tubo com pipeta de Pasteur (os tubos já estavam no banho algum tempo antes). Centrifugou-se 5 minutos a 1500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante com pipeta de plástico e procedeu-se à homogeneização

do material biológico. Adicionou-se ao pellet algumas gotas de solução fixadora gelada [ácido acético : metanol (1:4)], agitando-se no vórtex e de seguida completou-se o volume até aos 4 ml. Centrifugou-se novamente a 1500 rpm durante 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Procedeu-se a mais duas lavagens com a solução fixadora, de modo a que o sobrenadante se tornasse límpido. Removeu-se o sobrenadante e centrifugou-se a 1500 rpm durante 5 minutos. A seguir ressuspenderam-se as células num pequeno volume de solução fixadora. Após este processo, espalharam-se 3 gotas da suspensão de células com o auxílio de uma pipeta de Pasteur sobre lâminas cobertas com um filme de água. Deixaram-se secar ao ar na horizontal durante cerca de 3 dias.

Uma vez bem secas, procedeu-se à coloração das lâminas em tinas com Giemsa 4% em tampão fosfato de sódio pH 6.8 durante 8 minutos e à lavagem das mesmas com água corrente deixando-se secar ao ar.

Depois de secas fez-se a montagem de lamelas sobre as lâminas com Entellan e deixaram-se secar. Para a observação das lâminas foi usado o Microscópio Nikon Eclipse E400.

Para cada indivíduo foram contabilizadas 100 metafases, utilizando uma ampliação total de 1250x, tendo cada uma delas a totalidade dos seus cromossomas bem condensados e individualizados e adequadamente corados. Todas as lâminas foram codificadas e as contagens foram feitas por um só técnico, sem que este tivesse acesso aos dados dos indivíduos. Na identificação de AC foram consideradas metafases com 46 ± 1 cromossomas. Foram registadas aberrações do tipo cromossómico e cromatídico que incluem quebras num só cromatídeo ou em ambos, fragmentos acêntricos, cromossomas dicêntricos, cromossomas em forma de anel, gaps e aneuploidias de acordo com os critérios de classificação de Savage (1975).

Teste do Cometa

O Teste do Cometa foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Singh *et al.* (1988) com algumas alterações.

No dia anterior à técnica foi estendida uma camada homogénea de agarose de ponto de fusão normal (NMP - *Normal Melting Point*) a 1%, nas lâminas a utilizar, sendo depois colocadas a secar na horizontal. Para todas as amostras, foram preparadas duas lâminas (amostras em duplicado).

Para a realização desta técnica procedeu-se ao isolamento dos linfócitos a partir das amostras de sangue colhido (5 ml de sangue, 2.5 ml por cada réplica). O isolamento dos linfócitos foi feito por meio de um gradiente de densidade de Ficol Histopaque durante 30 minutos a 2000 rpm (1080g). O anel linfocitário resultante foi extraído e as

células foram lavadas 3x durante 10 minutos a 1000 rpm (270g), com tampão fosfato gelado a pH 7.2, com temperatura inferior a 4°C. Os linfócitos isolados de cada uma das amostras foram depois colocados em microtubos, previamente identificados, contendo 1 ml de tampão fosfato a pH 7.4. Foram realizadas diluições de cada amostra para se obter o número de células esperado, cerca de 100 000 células por cada lâmina. Estas diluições foram baseadas em contagens efetuadas numa câmara de Neubauer, tendo em conta o número de células pretendido e o número de células contabilizado, segundo a fórmula:

$$Z = \frac{Y \times 0.1}{X \times 1.5}$$

em que Z corresponde ao volume necessário em µl, Y corresponde ao número de células pretendido (cerca de 100000 células) e X que corresponde ao número de células contabilizado na câmara.

A viabilidade celular foi avaliada mediante a técnica de exclusão com azul de metileno (*Trypan blue*). Durante 2 minutos, 10 µl de linfócitos foram adicionados a 5 µl de solução *Trypan blue*. Ao término deste período foram analisadas 100 células (na câmara de Neubauer) e o número de células viáveis (que não incorporaram o corante) foi contabilizado. Em todas as amostras analisadas a viabilidade celular foi superior a 90%.

Os linfócitos colocados em microtubos foram depois recuperados por centrifugação a 9000 rpm (7500g) durante 3 minutos. Desprezou-se o sobrenadante. Em seguida as células, cuidadosamente ressuspensas em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP - *Low Melting Point*) a 0.6% (em tampão fosfato a pH 7.4) previamente aquecida e mantida em banho maria a 37°C, foram espalhadas sobre a primeira camada de agarose e cobriram-se com lamela. As lâminas foram depois colocadas durante 4 minutos sobre o gelo. Retirou-se cuidadosamente a lamela e as preparações foram submersas em solução de lise (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, TrisBase, 10 mM NaOH 10 M, pH 10 e 1% de Triton X-100, adicionado pouco antes da submersão das lâminas) durante 1 hora a 4 °C.

A partir deste ponto o processo foi todo realizado no escuro para prevenir qualquer dano adicional no ADN. Depois da lise, as lâminas foram colocadas sobre um suporte e lavadas 2x com água bidestilada gelada; sendo que na última lavagem as lâminas permaneceram cobertas com água durante 15 minutos. Foram em seguida distribuídas numa tina de electroforese arrefecida a uma temperatura constante de cerca de 4°C, e cobertas com solução de tampão de electroforese (Na₂EDTA 200mM e NaOH 10 mM) durante 20 minutos, para permitir o desenrolamento do ADN e a expressão das

regiões alcali-lábeis. De seguida levou-se a cabo a electroforese durante 20 minutos a 300 mA e 30 V (1V/cm).

Após a electroforese as lâminas foram lavadas com 1 ml de solução de tampão de neutralização (TrisBase 0.4 M, pH 7.5) durante 10 minutos. Depois de retirado o excesso de solução, as preparações foram coradas durante 20 minutos com 100 µL de uma solução de brometo de etídeo (20 µg/ml) e cobertas com lamela. Uma vez coradas foi-lhes retirada a lamela e lavadas com água bidestilada gelada durante 20 minutos. Depois de retirado o excesso de água as lâminas foram montadas novamente com lamela. Foram posteriormente observadas num período máximo de 48 horas e guardadas sem lamela a 4°C numa caixa protegida da luz, humedecida e selada para manter a hidratação do gel.

As lâminas foram observadas ao Microscópio Nikon Eclipse E400 com corpo para epifluorescência com lâmpada de mercúrio e filtro 6-2A (Nikon C-SA61), com uma ampliação de 500x (ocular, 12.5x; objetiva, 40x).

A contagem das células foi efetuada através do programa *Comet IV (Perspective Instruments)* o que permitiu medir em tempo real, célula a célula, a quantidade de ADN na cauda, expressa em percentagem (%TADN). Por cada amostra foram contabilizadas aleatoriamente 100 células, 50 por cada réplica. Os dados apresentados são a média dos valores obtidos para as 100 células.

Com vista a correlacionar os diferentes biomarcadores estudados e avaliar a exposição a FA procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos.

3. Análise estatística

Na análise estatística dos resultados foi utilizado a versão 21.0 do programa SPSS para Windows. Foram consideradas como variáveis dependentes os diferentes tipos de AC [gaps, quebras por célula, células aberrantes, células multi-aberrantes e aneuploidias (45 e 47 cromossomas)]. As quebras por célula, equivalem à quantidade de quebras por cada indivíduo (número de quebras por cada 100 metafases), as células aberrantes, correspondem às células que contêm apenas uma quebra (seja cromatídica ou cromossómica) (Khalil, 1995, Ishidate *et al.*, 1998), as células multi-aberrantes correspondem às células que contêm mais do que uma quebra (dizem respeito às figuras homólogas e radiais, cromossomas dicêntricos, anéis e células que contenham pelo menos duas quebras cromatídicas ou cromossómicas) (Castella *et al.*, 2011) e %TADN, que corresponde à percentagem de ADN na cauda dos cometas.

Como variáveis independentes consideraram-se os valores de formaldeído (FA) no ar, o género, a idade, os hábitos tabágicos e duração do tempo de exposição. Quando necessário, estabeleceram-se diferentes classes, tendo em conta a amplitude e a homogeneidade do número de elementos. O pressuposto da normalidade foi testado através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando as variáveis estudadas obedeciam a uma distribuição normal (gaps e %TADN) foi utilizado o teste de *t*-Student para testar a influência das variáveis independentes sobre as referidas e One-Way Anova (com Bonferroni para correções) para a comparação de médias entre os grupos. Quando a distribuição das variáveis se desviava significativamente da distribuição normal (quebras, quebras por célula, células aberrantes, células multi-aberrantes e aneuploidias) foram aplicados testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). As associações entre duas variáveis foram testadas com a correlação de Pearson's ou Spearman (conforme fossem variáveis de distribuição normal ou não, respetivamente). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas com um intervalo de confiança de 95% ($P < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Caraterização da população

A população em estudo foi constituída por um conjunto de 75 profissionais dos serviços hospitalares de anatomia patológica dos distritos do Porto e Aveiro. Foi também constituída uma população controlo, formada por 76 indivíduos do setor terciário da área da educação e dos sistemas multimédia com um historial ocupacional de não exposição a formaldeído (FA) e com caraterísticas semelhantes às do grupo exposto.

As principais caraterísticas dos dois grupos estudados, nomeadamente, sexo, idade, hábitos tabágicos e tempo de exposição, estão descriminadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Caraterísticas da população estudada

	Grupo Controlo N = 76	Grupo Exposto N = 75
Número de indivíduos por género	54 Mulheres (71%) 22 Homens (29%)	55 Mulheres (73%) 20 Homens (27%)
Idade (em anos) ^a	37.59 ± 9.99 (23 – 61)	37.91 ± 9.40 (23 – 60)
Tempo de exposição (em anos) ^a		10.88 ± 8.23 (1 – 36)
Hábitos tabágicos		
Não fumadores	59 (78%)	59 (79%)
Fumadores	17 (22%)	16 (21%)
Nº cigarros/dia ^a	12.41 ± 7.87 (1 – 30)	11.63 ± 4.82 (4 – 20)
Nº Anos Fumador ^a	20.82 ± 12.59 (3 – 51)	16.25 ± 8.79 (3 – 35)

^a média ± desvio padrão (intervalo)

3.2. Avaliação ambiental e Avaliação biológica

3.2.1. Avaliação ambiental e biomarcadores de genotoxicidade estudados

Na Tabela 6 são apresentados os valores referentes à concentração média ponderada no tempo (TWA) de exposição a formaldeído (FA) e dos biomarcadores de genotoxicidade estudados, nomeadamente, os diferentes tipos de aberrações cromossómicas (AC) e %TADN (avaliado pelo teste do cometa).

A concentração média ponderada de FA obtida para os trabalhadores dos serviços de anatomia patológica estudados, tendo em conta a sua jornada laboral normal, foi de 0.41 ppm (variando entre 0.06 e 1.58 ppm).

Tabela 6 – Valores da concentração média ponderada de FA (TWA) e dos diferentes biomarcadores estudados para o grupo controlo e o exposto

	Grupo Controlo (N=76)	Grupo Exposto (N=75)
FA (ppm)^a	—	0.41 ± 0.04 (0.06 - 1.58)
Gaps^a	4.66 ± 0.36 (0 - 14)	6.48 ± 0.32 * (1 - 13)
Quebras por Célula^a	0.028 ± 0.003 (0 - 0.13)	0.061 ± 0.003 * (0.01 - 0.22)
Células Aberrantes^a	2.47 ± 0.20 (0 - 9)	4.01 ± 0.24 * (0 - 10)
Células Multi-Aberrantes^a	0.17 ± 0.05 (0 - 2)	0.75 ± 0.10 * (0 - 3)
Aneuploidias^a	2.66 ± 0.20 (0 - 7)	3.56 ± 0.19 * (0 - 7)
%TADN^a	7.82 ± 0.47 (0.9 - 24.4)	11.19 ± 0.56 * (2.9 - 24.9)

^a média ± erro padrão média (intervalo)

* $P < 0.001$, em relação ao grupo controlo

Após a análise dos resultados obtidos para os indicadores de dano genético, verificou-se que as frequências de todos os tipos de AC estudados são significativamente superiores no grupo exposto em relação ao grupo controle ($P < 0.001$). Para o indicador de dano no ADN, avaliado pelo teste do cometa (%TADN), obtiveram-se também valores significativamente superiores no grupo exposto relativamente ao grupo controle ($P < 0.001$).

Para uma melhor visualização das diferenças relativas aos dados apresentados na tabela anterior, os mesmos estão também representados sob a forma de gráfico na Figura 12.

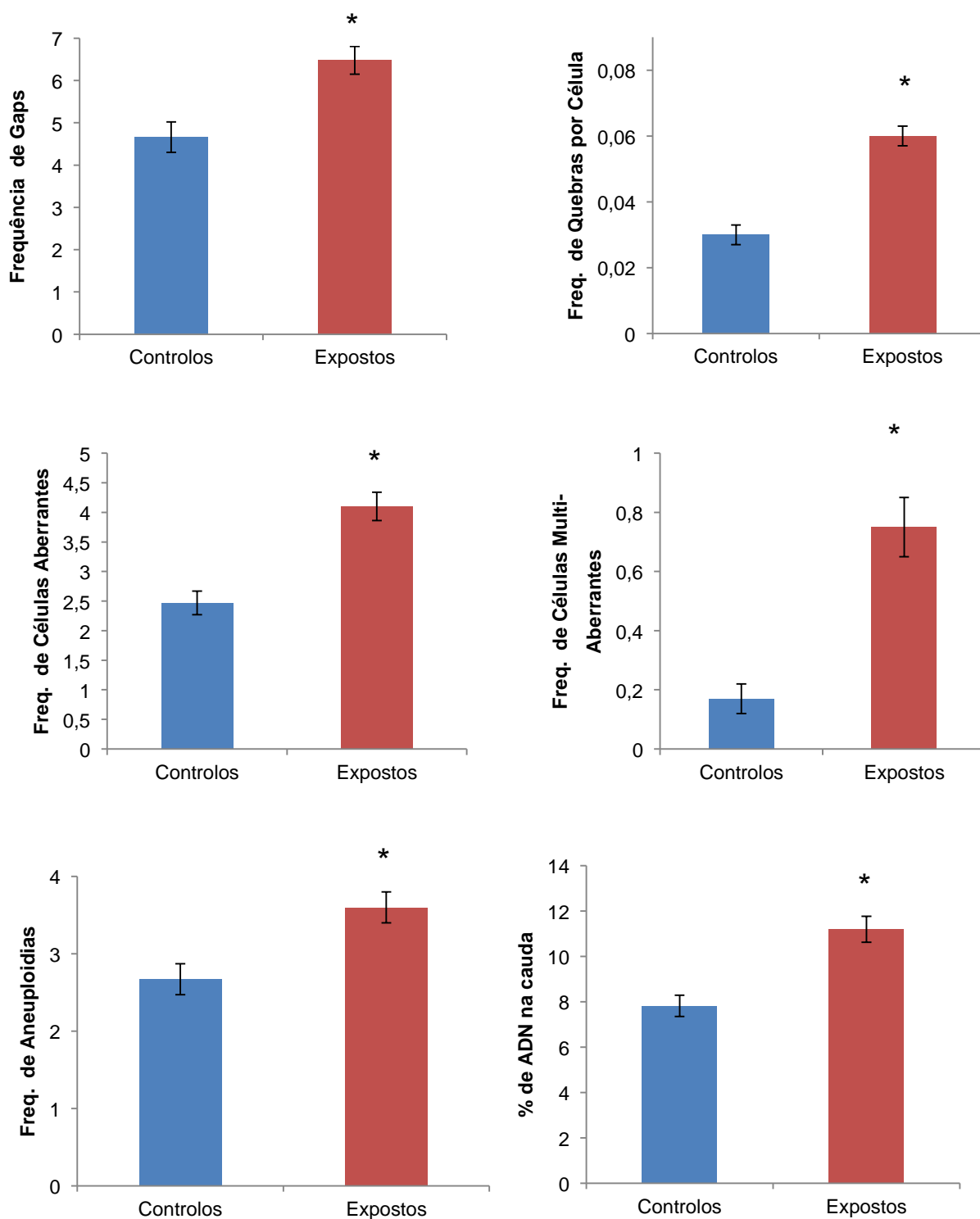


Figura 12 - Resultados obtidos referentes à influência da exposição na frequência dos indicadores gaps, quebras por célula, células aberrantes, células multi-aberrantes, aneuploidias e %TADN.
 (* $P < 0.001$, quando comparado com o grupo controle)

3.2.2. Avaliação biológica

3.2.2.1. Influência do género na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados

Analisando o efeito do género nos biomarcadores de dano genético verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.001$) nas aberrações cromossómicas do tipo células multi-aberrantes no grupo exposto. Nesse grupo, as mulheres apresentam, em média, uma frequência superior de células multi-aberrantes quando comparadas com os homens.

No grupo controlo não se observaram diferenças em nenhum dos indicadores estudados. Os valores obtidos para cada um dos biomarcadores encontram-se discriminados na Tabela 7.

Tabela 7 – Efeito do género nos diferentes biomarcadores de genotoxicidade

	Controlos		Expostos	
	Feminino (N=54)	Masculino (N=22)	Feminino (N=55)	Masculino (N=20)
Gaps^a	4.69 ± 0.42 (0 – 14)	4.59 ± 0.69 (0 – 10)	6.40 ± 0.39 (1 – 13)	6.70 ± 0.60 (2 – 11)
Quebras por Célula^a	0.031 ± 0.003 (0 – 0.13)	0.021 ± 0.004 (0 – 0.08)	0.063 ± 0.004 (0.01 – 0.14)	0.054 ± 0.007 (0.01 – 0.13)
Células Aberrantes^a	2.65 ± 0.25 (0 – 9)	2.05 ± 0.35 (0 – 6)	3.98 ± 0.27 (0 – 10)	4.10 ± 0.51 (1 – 8)
Células Multi-Aberrantes^a	0.22 ± 0.06 (0 – 2)	0.05 ± 0.05 (0 – 1)	0.95 ± 0.11 * (0 – 3)	0.20 ± 0.09 (0 – 1)
Aneuploidias^a	2.85 ± 0.22 (0 – 6)	2.18 ± 0.43 (0 – 7)	3.56 ± 0.23 (0 – 7)	3.55 ± 0.37 (0 – 7)
%TADN^a	7.89 ± 0.60 (0.9 – 24.4)	7.67 ± 0.69 (2.8 – 15.9)	11.10 ± 0.65 (4.2 – 24.9)	11.43 ± 1.20 (2.9 – 22.1)

^a média ± erro padrão média (intervalo)

* $P < 0.001$, em relação aos homens do grupo exposto

3.2.2.2. Influência da idade na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados

De modo a avaliar o efeito do fator idade na frequência dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas (AC) e %TADN, estabeleceram-se cinco classes etárias: Classe 1 (23 – 29 anos), Classe 2 (30 – 34 anos), Classe 3 (35 – 39 anos), Classe 4 (40 – 49 anos) e Classe 5 (> 50 anos), tendo em conta a amplitude e homogeneidade do número de elementos. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 8 (grupo controlo) e na Tabela 9 (grupo exposto).

Tabela 8 – Efeito da idade nos biomarcadores de genotoxicidade, no grupo controlo

Grupo Controlo (N=76)	Classe 1 23 – 29 anos (N=17)	Classe 2 30 – 34 anos (N=15)	Classe 3 35 – 39 anos (N=19)	Classe 4 40 – 49 anos (N=11)	Classe 5 >50 anos (N=14)
Gaps^a	3.53 ± 0.49 (1 – 7)	6.07 ± 0.78 (1 – 11)	4.74 ± 0.88 (0 – 14)	4.36 ± 0.99 (0 – 12)	4.64 ± 0.73 (1 – 10)
Quebras por Célula^a	0.029 ± 0.007 (0 – 0.13)	0.029 ± 0.005 (0 – 0.06)	0.031 ± 0.004 (0 – 0.08)	0.020 ± 0.005 (0 – 0.05)	0.028 ± 0.005 (0 – 0.07)
Células Aberrantes^a	2.47 ± 0.54 (0 – 9)	2.80 ± 0.51 (0 – 5)	2.68 ± 0.37 (0 – 6)	1.82 ± 0.44 (0 – 5)	2.36 ± 0.37 (0 – 5)
Células Multi- Aberrantes^a	0.24 ± 0.14 (0 – 2)	0.07 ± 0.07 (0 – 1)	0.21 ± 0.10 (0 – 1)	0.09 ± 0.09 (0 – 1)	0.21 ± 0.11 (0 – 1)
Aneuploidias^a	2.53 ± 0.42 (0 – 5)	3.27 ± 0.52 (0 – 7)	2.11 ± 0.35 (0 – 5)	2.55 ± 0.55 (0 – 6)	3.00 ± 0.46 (0 – 6)
%TADN^a	8.87 ± 1.21 (4.5 – 24.4)	7.38 ± 0.86 (2.8 – 15.9)	7.15 ± 0.98 (0.9 – 17.8)	8.39 ± 1.52 (3.1 – 21.0)	7.50 ± 0.68 (3.8 – 10.6)

^a média ± erro padrão da média (intervalo)

Tabela 9 - Efeito da idade nos biomarcadores de genotoxicidade estudados, no grupo exposto

Grupo Exposto (N=75)	Classe 1 23 – 29 anos (N=16)	Classe 2 30 – 34 anos (N=19)	Classe 3 35 – 39 anos (N=10)	Classe 4 40 – 49 anos (N=19)	Classe 5 >50 anos (N=11)
Gaps ^a	6.13 ± 0.65 (1 – 10)	6.21 ± 0.57 (2 – 11)	6.50 ± 1.09 (2 – 11)	7.26 ± 0.75 (1 – 13)	6.09 ± 0.78 (2 – 10)
Quebras por Célula ^a	0.058 ± 0.009 (0.01 – 0.14)	0.048 ± 0.006 (0.01 – 0.1)	0.071 ± 0.011 (0.02 – 0.14)	0.063 ± 0.005 (0.04 – 0.10)	0.076 ± 0.007 ^{*, +} (0.04 – 0.13)
Células Aberrantes ^a	4.13 ± 0.46 (1 – 8)	3.21 ± 0.51 (0 – 8)	4.00 ± 0.47 (2 – 6)	4.47 ± 0.54 (1 – 10)	4.45 ± 0.61 (1 – 8)
Células Multi- Aberrantes ^a	0.50 ± 0.20 (1 – 8)	0.53 ± 0.19 (0 – 3)	1.10 ± 0.28 (0 – 2)	0.74 ± 0.15 (0 – 2)	1.18 ± 0.26 ^{*, +} (0 – 3)
Aneuploidias ^a	3.19 ± 0.40 (0 – 6)	3.58 ± 0.32 (1 – 6)	3.90 ± 0.55 (2 – 7)	3.79 ± 0.44 (0 – 7)	3.36 ± 0.56 (0 – 6)
%TADN ^a	11.98 ± 1.30 (4.2 – 24.4)	9.49 ± 0.94 (4.3 – 20.4)	8.94 ± 1.36 (2.9 – 16.1)	12.70 ± 1.12 (4.7 – 23.9)	12.41 ± 1.71 (5.2 – 24.9)

^a média ± erro padrão da média (intervalo)

^{*} $P < 0.05$, em relação à Classe 1

⁺ $P < 0.05$, em relação à Classe 2

Após a análise dos resultados obtidos, verificou-se que existiam diferenças significativas em apenas algumas classes etárias, no grupo exposto. No que respeita às células multi-aberrantes, verificou-se existirem diferenças significativas entre as Classes 5 e 1 ($P < 0.05$); e entre as Classes 5 e 2 ($P < 0.05$) sendo que as frequências mais elevadas foram registadas na classe 5 (indivíduos mais velhos). Relativamente às quebras por célula, também se observou um aumento significativo da frequência deste tipo de AC com a idade, mais especificamente entre as Classes 5 e 1 e entre as Classes 5 e 2. No grupo controlo não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes classes etárias, tendo em conta todos os biomarcadores de genotoxicidade estudados.

De um modo geral pode observar-se em ambos os grupos uma tendência de aumento do dano com o aumento da idade.

3.2.2.3. Influência dos hábitos tabágicos na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados

Os resultados relativos à influência dos hábitos tabágicos nos diferentes indicadores de dano genético estudados, estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Efeito dos hábitos tabágicos nos diferentes biomarcadores de genotoxicidade

	Controlos		Expostos	
	Não Fumadores (N=59)	Fumadores (N=17)	Não Fumadores (N=59)	Fumadores (N=16)
Gaps^a	5.03 ± 0.40 * (0 – 14)	3.35 ± 0.68 (0 – 9)	6.49 ± 0.37 (1 – 13)	6.44 ± 0.74 (1 – 11)
Quebras por Célula^a	0.028 ± 0.002 (0 – 0.07)	0.029 ± 0.008 (0 – 0.13)	0.059 ± 0.004 (0.01 – 0.14)	0.069 ± 0.007 (0.01 – 0.14)
Células Aberrantes^a	2.44 ± 0.20 (0 – 6)	2.59 ± 0.58 (0 – 9)	3.86 ± 0.27 (0 – 10)	4.56 ± 0.52 (1 – 8)
Células Multi- Aberrantes^a	0.17 ± 0.05 (0 – 1)	0.18 ± 0.13 (0 – 2)	0.80 ± 0.11 (0 – 3)	0.56 ± 0.18 (0 – 2)
Aneuploidias^a	3.02 ± 0.21 * (0 – 7)	1.41 ± 0.38 (0 – 4)	3.68 ± 0.23 (0 – 7)	3.13 ± 0.30 (0 – 4)
%TDNA^a	8.09 ± 0.54 (2.8 – 24.4)	6.91 ± 0.94 (0.9 – 15.9)	11.49 ± 0.69 (2.9 – 24.9)	10.11 ± 0.84 (4.7 – 15.6)

^a média ± erro padrão da média (intervalo)

* $P < 0.05$, em relação aos Fumadores do grupo controlo

⁺ $P < 0.01$, em relação aos Fumadores do grupo controlo

No grupo exposto, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os fumadores e os não fumadores nos diferentes biomarcadores de genotoxicidade estudados.

No grupo controlo foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) na frequência gaps e aneuploidias, entre os indivíduos fumadores e os não

fumadores, sendo que os valores mais elevados se obtiveram em indivíduos não fumadores. Em todos os outros indicadores estudados, não se verificaram diferenças significativas.

3.2.2.4. Influência do tempo de exposição na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade estudados

Para avaliar o efeito do tempo de exposição (equivalente aos anos de trabalho) nos biomarcadores de genotoxicidade estudados, estabeleceram-se três classes diferentes: Classe I (1 – 9 anos), Classe II (10 – 19 anos) e Classe III (20 – 36 anos), tendo em conta a amplitude e homogeneidade do número de elementos. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Efeito do tempo de exposição na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade, no grupo exposto

	Classe I (1 – 9 anos) (N=35)	Classe II (10 – 19 anos) (N=29)	Classe III (20 – 36 anos) (N=11)
Gaps^a	5.94 ± 0.41 (1 - 10)	6.97 ± 0.57 (1 - 11)	6.91 ± 1.0 (2 - 13)
Quebras por Célula^a	0.053 ± 0.005 (0.01 – 0.14)	0.066 ± 0.005 * (0.02 – 0.14)	0.073 ± 0.008 * (0.04 ± 0.13)
Células Aberrantes^a	3.71 ± 0.33 (0 – 8)	4.03 ± 0.43 (1 – 10)	4.91 ± 0.48 (3 – 8)
Células Multi-Aberrantes^a	0.51 ± 0.14 (0 – 3)	1.00 ± 0.15 * (0 – 3)	0.82 ± 0.23 (0 – 2)
Aneuploidias^a	3.43 ± 0.24 (0 – 6)	3.86 ± 0.38 (0 – 7)	3.18 ± 0.48 (0 – 5)
%TADN^a	11.02 ± 0.83 (4.2 – 24.4)	10.91 ± 0.89 (2.9 – 23.9)	12.48 ± 1.70 (5.2 – 24.9)

^a média ± erro padrão da média (intervalo)

* $P < 0.05$, em relação à Classe I

+ $P < 0.01$, em relação à Classe I

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) no que respeita às quebras por célula entre as Classes II e I e entre as Classes III e I. Em relação à variável células multi-aberrantes, também se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.01$) entre as Classes II e I. Tanto na variável quebras

por célula como nas células multi-aberrantes, os valores mais elevados foram registados em indivíduos com maior tempo de exposição.

No que se refere aos outros indicadores, não se observaram diferenças estatisticamente significativas mas, de um modo geral, verificou-se uma tendência de aumento dos seus valores médios com o aumento da duração da exposição.

3.2.2.5. Associações entre os diferentes biomarcadores de genotoxicidade estudados

De modo a explorar as associações entre as variáveis em estudo, analisámos as associações existentes entre elas, através da correlação de Pearson's ou Spearman. Em relação a todos os biomarcadores de genotoxicidade estudados no que diz respeito aos diferentes tipos de aberrações cromossómicas (AC) e %TADN, observaram-se associações significativas (Tabela 12).

Tabela 12 - Associações entre os biomarcadores de genotoxicidade estudados

	Gaps	Quebras por célula	Células aberrantes	Células multi-aberrantes	Aneuploidias
%TADN	$r = 0.302$	$r = 0.319$	$r = 0.229$	$r = 0.218$	$r = 0.176$
	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P = 0.005$	$P = 0.007$	$P = 0.031$

Pelos dados observados na tabela anterior, pode-se verificar que todos os diferentes tipos de AC estudados se correlacionam significativamente ($P < 0.05$) com a %TADN. Estas associações são no entanto relativamente fracas do ponto de vista estatístico.

4. Discussão

O formaldeído (FA) é um agente químico carcinogénico produzido em larga escala a nível mundial, o que suscita diversas questões relacionadas com a sua utilização. A sua importância comercial é substancialmente elevada, tendo em conta o seu baixo custo de produção, aliado ao uso multifacetado em diferentes aplicações. São largamente conhecidas as suas propriedades de desinfeção e preservação, sendo por isso frequentemente utilizado em laboratórios de anatomia patológica, na manutenção e conservação de tecidos. Diversos estudos apontam estes locais de trabalho como locais de risco elevado de exposição a FA (Shaham *et al.*, 2002; Ferro *et al.*, 2005; Jakab *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011), por apresentarem valores de concentração de FA acima dos limites estabelecidos. Estes estudos revelam ainda que a principal sintomatologia associada à exposição a FA se manifesta ao nível das vias respiratórias superiores e oculares (por efeito irritante ao nível desses órgãos), sendo a severidade dos sintomas dependente da concentração de composto no ar que atinge os locais alvo.

Tendo em conta que o objetivo do estudo foi avaliar o dano genotóxico que resulta da exposição ocupacional dos trabalhadores de laboratórios de anatomia patológica a FA, procedeu-se à estimativa da exposição pelo cálculo da concentração média ponderada (TWA) para cada um dos indivíduos expostos, tendo-se constatado que o valor médio de exposição para a população estudada foi de 0.41 ppm. Verificou-se no grupo exposto (n=75) que 61% dos trabalhadores estavam expostos a valores abaixo de 0.3 ppm e 39% estavam expostos a valores acima de 0.3 ppm. Destes últimos, constatou-se que 28% dos indivíduos estava exposto a valores médios de FA entre 0.3 e 0.4 ppm, 13% estavam expostos a valores médios entre 0.4 ppm e 0.5 ppm e 59% estavam expostos a valores médios superiores a 0.5 ppm. Os níveis mais elevados de exposição foram obtidos durante o exame macroscópico das peças conservadas em FA e durante o despejo das peças e respetivas soluções, tal como já havia sido observado por outros autores (Orsière *et al.*, 2006; Viegas *et al.*, 2010). Os valores sugerem uma situação de risco profissional, uma vez que os valores obtidos indicam que os trabalhadores poderão estar expostos a valores acima do recomendado (IPQ, 2007; SCOEL, 2008). Estes dados estão de acordo com os resultados reportados por vários autores em estudos anteriormente realizados, que observaram níveis de exposição a FA superiores aos estabelecidos pelas normas em vigor (Viegas e Prista, 2009; Costa *et al.*, 2011).

A biomonitorização humana em ambiente ocupacional ganha cada vez mais importância, dada a elevada proporção de agentes químicos atualmente utilizados nas

mais variadas áreas laborais e dos potenciais efeitos na saúde pública, em particular, em termos de incidência ou aumento de risco de cancro. Ao longo dos anos têm surgido diversos estudos que apontam para uma associação entre a exposição a agentes químicos genotóxicos e o aumento de risco de cancro, sendo os biomarcadores de efeito uma ferramenta útil no estudo de alterações precoces que ocorrem antes do desenvolvimento da doença. Estes incidem principalmente em biomarcadores de genotoxicidade, nomeadamente, as aberrações cromossómicas (AC), micronúcleos (MN), trocas entre cromatídeos irmãos (SCE) e teste do cometa. Existem diversos estudos relativamente ao uso destes biomarcadores na avaliação da exposição a outros agentes químicos, por aplicação dessas mesmas técnicas, nomeadamente, ao tolueno (Heuser *et al.*, 2007; Manikantan *et al.*, 2010), a pesticidas (Carbonell *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2006) e ao estireno (Anwar, 1994; Teixeira *et al.*, 2004). Em termos de exposição ocupacional a FA, existem diversos trabalhos que utilizam estes mesmos biomarcadores, como forma de avaliar o potencial genotóxico do FA, nomeadamente, AC (Jakab *et al.*, 2010; Santovito *et al.*, 2011), SCE (Shaham *et al.*, 2002), MN (Orsière *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008) e teste do cometa (Costa *et al.*, 2011).

No que respeita aos biomarcadores de genotoxicidade utilizados neste trabalho para avaliar o dano genético (AC e teste do cometa), verificou-se que os indivíduos ocupacionalmente expostos a FA (concentração média de 0.41 ppm), apresentam níveis de dano genético significativamente superiores ($P < 0.05$), quando comparados com os do grupo controlo.

As AC são um biomarcador extensamente utilizado em estudos de biomonitorização humana, no entanto, existem poucos estudos que utilizam este biomarcador na monitorização biológica da exposição a FA (Santovito *et al.*, 2011). Isto deve-se ao fato de existirem diversas limitações da técnica, nomeadamente, custo e intensivo tempo de análise, necessidade de pessoal treinado e especializado para realizar a técnica e necessidade de cultura celular (European Commission, 2009).

Da análise dos resultados obtidos no que respeita ao dano cromossómico, avaliado pela frequência dos diferentes tipos de AC, podemos verificar que este parâmetro é influenciado significativamente pela exposição a FA, sendo que os indivíduos do grupo exposto apresentam um dano superior aos do grupo controlo ($P < 0.05$). O mesmo resultado foi obtido por Jakab *et al.* (2010), quando estudaram a frequência de diferentes tipos de AC (gaps, aneuploidias, AC cromatídicas, AC cromossómicas e AC totais) num grupo de profissionais de serviços de anatomia patológica (n=37) expostos a FA (0.73 ppm), quando comparados com um grupo controlo (n=37).

Todavia, outros autores referem não terem observado uma associação entre exposição a FA e o dano cromossómico (Thomson *et al.*, 1984; Pala *et al.*, 2008).

No que diz respeito à avaliação do dano genético por exposição a FA, foi utilizado neste estudo um dos parâmetros mais utilizados no teste do cometa, a %TADN. Verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) entre os indivíduos do grupo exposto e os do grupo controlo; sendo que os valores mais elevados de dano se observaram no grupo exposto. Isto significa que estes indivíduos apresentam, em média, uma percentagem de ADN na cauda do cometa superior à dos elementos do grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com um estudo de Yu *et al.* (2005) no qual é documentado um aumento significativo no comprimento da cauda do cometa em linfócitos de indivíduos ocupacionalmente expostos a FA (n=151) a concentrações médias compreendidas entre 0.08 e 6.4 ppm, relativamente a um grupo controlo (n=112). Mais recentemente, o mesmo foi observado noutro estudo, num grupo de profissionais de laboratórios de anatomia patológica (n=48) por comparação com um grupo controlo (n=50), no qual se obteve um aumento de dano genético, avaliado pelo teste do cometa (%TADN) nos trabalhadores expostos comparativamente ao grupo controlo (Costa *et al.*, 2011).

O teste do cometa, apesar de ser uma técnica simples e rápida e já ter sido desenvolvida há cerca de três décadas, apenas nos últimos anos se verificou um maior desenvolvimento, aperfeiçoamento e aumento da sua aplicação. Existem atualmente poucos estudos ao nível de exposição ocupacional a FA, no entanto, este biomarcador foi já aplicado em vários estudos de exposição a agentes químicos, nomeadamente pesticidas (Zeljezic, 2001), estireno (Laffon *et al.*, 2002), gases anestésicos (Chandrasekhar *et al.*, 2006) e arsénio (Vuyyuri *et al.*, 2006). Existem também alguns estudos *in vitro* que demonstraram a elevada sensibilidade e aplicabilidade deste biomarcador na avaliação do efeito genotóxico do FA (Frenzilli *et al.*, 2000; Im *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Sul *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi obtida uma correlação estatisticamente significativa ($P < 0.05$) entre os diferentes tipos de AC e a %TADN. Estudos anteriores suportam esta relação entre os dois biomarcadores de dano genético estudados, nomeadamente, Zeljezic e Garaj-Vrhovac (2001) que utilizaram o teste das AC (quebras cromatídicas e cromossómicas, fragmentos acêntricos, cromossomas dicêntricos, figuras e AC totais) e o teste do cometa para avaliar o dano numa população exposta a pesticidas. Ao longo dos últimos anos têm surgido diversos estudos que remetem para a complementaridade de resultados obtidos entre estas duas técnicas (Giannotti, 2002; Hartmann *et al.*, 2003).

Está largamente demonstrado em estudos de biomonitorização humana que características como a idade, género e hábitos tabágicos são importantes, uma vez que podem constituir fatores de confundimento para os parâmetros avaliados (Maluf, 2004; Vodicka *et al.*, 2004; Iarmarcovai *et al.*, 2007). Por conseguinte, tendo em conta as

caraterísticas da população em estudo procedeu-se à análise do efeito destes mesmos fatores e tempo de exposição nos indicadores biológicos estudados.

No que respeita à influência do género nos diferentes tipos de AC e %TADN estudados, obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas apenas em relação às células multi-aberrantes no grupo exposto. Os valores mais elevados foram observados nas mulheres, quando comparadas com os homens desse grupo.

No que respeita ao grupo controlo, observou-se que as mulheres têm, em média, maior dano genético que os homens, apesar de não ser estatisticamente significativo. Os resultados obtidos estão de acordo com Hedner *et al.* (1982) que observaram, num grupo de 100 indivíduos, diferenças significativas entre os dois géneros, sendo que as mulheres apresentaram maior dano que os homens. Mais recentemente, Musak *et al.* (2013) realizaram um estudo que incidiu sobre trabalhadores de equipas médicas (n=601) expostos a anestésicos, drogas anti-neoplásicas e FA, tendo chegado à conclusão que as mulheres se encontram em maior risco, tendo frequências de AC (AC cromatídicas, AC cromossómicas – anéis, cromossomas dicêntricos e figuras- e AC totais) superiores comparativamente com as frequências obtidas para os homens.

Estes dados podem ser explicados por aumento de AC em mulheres que tomam contraceptivos orais (Hedner *et al.*, 1982) ou também devido a flutuações verificadas ao nível de diferentes taxas de AC durante o ciclo menstrual, possivelmente devido a oscilações hormonais (Landi e Barale, 1999).

Relativamente ao teste do cometa, neste trabalho não se verificou influência do fator género, tal como reportado por outros autores (Moller, 2006; Angerer *et al.*, 2007).

Com o aumento da idade, o organismo vai acumulando dano genético, resultante da natural perda de função dos mecanismos de reparação, replicação (Bolognesi *et al.*, 1997) e da diminuição da atividade da enzima telomerase, principal responsável pela regeneração dos telómeros (Aubert e Lansdorp, 2008). Estes são alguns dos principais fatores responsáveis pela estabilidade cromossómica, sendo que na sua ausência ou quando se verifica a diminuição da sua atividade, podem resultar instabilidades cromossómicas.

No que diz respeito à influência do fator idade nos biomarcadores de genotoxicidade estudados, verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) no grupo exposto e nas variáveis quebras por célula e células multi-aberrantes. Estas diferenças observaram-se entre as classes 5 (> 50 anos) e 1 (23 - 29 anos) e entre as classes 5 (> 50 anos) e 2 (30-34 anos), ou seja, com o aumento da idade observou-se um aumento do dano cromossómico no grupo exposto.

As AC estão relacionadas com a diminuição da eficácia dos mecanismos de reparação e, assim, com o aumento da idade surgem estruturas cromossómicas mais

complexas, relacionadas com os erros ocorridos durante o processo normal de funcionamento do ciclo celular (Wojda e Witt, 2003).

Em relação ao grupo controlo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das variáveis estudadas, no entanto, pode-se observar um aumento das suas frequências com o aumento da idade. O aumento de AC com o aumento da idade é um facto referenciado por vários autores (Hedner *et al.*, 1982; Ramsey *et al.*, 1995; Vodicka *et al.*, 2004).

Relativamente ao teste do cometa, os dados obtidos estão em concordância com outros autores, que indicam não haver influência da idade no dano genético avaliado por este teste (Laffon *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

O fumo do tabaco possui uma larga gama de agentes químicos potencialmente perigosos para a saúde (Wong *et al.*, 1997). Este fator traduz-se numa exposição prolongada a esses químicos em pequenas quantidades. Existem diversos estudos que apontam para a influência dos hábitos tabágicos na frequência de dano genético (DeMarini, 2004; Ergene *et al.*, 2007).

No que respeita à influência dos hábitos tabágicos, verificámos diferenças significativas entre não fumadores e fumadores apenas no grupo controlo, em dois tipos diferentes de AC, gaps e aneuploidias. Os valores mais elevados obtiveram-se em indivíduos não fumadores desse grupo comparativamente com os fumadores. Almeida *et al.* (2005), também verificaram um aumento de gaps e aneuploidias entre não fumadores e fumadores, sendo superiores nos não fumadores, não tendo no entanto, atingido a significância.

Estes dados poderão ser explicados pela ocorrência de processos de adaptação nos mecanismos de reparação do organismo, face à exposição contínua a agentes genotóxicos (Costa *et al.*, 2008). Esta capacidade de adaptação dos mecanismos de reparação é um facto já largamente estudado. Wolff *et al.* (1988) observaram que o organismo pode, após exposição continuada a pequenas doses de agentes químicos ou até mesmo de radiação ionizante, tornar-se menos suscetível ao seu efeito, não se verificando um aumento de dano por doses mais elevadas e prolongadas do mesmo agente.

No grupo exposto e relativamente aos hábitos tabágicos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos biomarcadores estudados.

No que respeita à influência dos hábitos tabágicos na %TADN, não se verificaram diferenças significativas, o que vem igualmente de acordo com estudos de outros autores (Angerer *et al.*, 2007; Moller, 2006).

Em relação à influência do tempo de exposição (grupo exposto) nos biomarcadores de genotoxicidade estudados, verificaram-se diferenças estatisticamente

significativas ($P < 0.05$). Essas diferenças foram obtidas relativamente às variáveis quebras por célula entre as classes II (10 – 19 anos) e I (1 – 9 anos) e as classes III (20 – 36 anos) e I (1 – 9 anos) e também às células multi-aberrantes, entre as classes II (10 – 19 anos) e I (1 – 9 anos), sendo o dano significativamente ($P < 0.05$) mais elevado nas classes com maior tempo de exposição.

Estes valores estão de acordo com os obtidos por outros autores para a influência do tempo de exposição, utilizando as AC (AC totais e aneuploidias), MN e teste do cometa (Roma-Torres *et al.*, 2006). Celik *et al.* (2007) estudaram o dano genotóxico num grupo de trabalhadores de uma mina de carvão e observaram um aumento de dano cromossômico (diferentes tipos de AC - quebras cromatídicas e cromossômicas, cromossomas dicêntricos, figuras e células aberrantes) com o aumento do tempo de exposição. Num outro estudo, Costa *et al.* (2006) investigaram os efeitos citogenéticos e moleculares da exposição a pesticidas num grupo de agricultores. Em termos de AC (quebras cromatídicas e cromossômicas, aneuploidias e AC totais), obtiveram um aumento do dano cromossômico com o aumento do tempo de exposição.

No que respeita à %TADN, não se verificou influência do tempo de exposição, o que está de acordo com estudos de outros autores (Costa *et al.*, 2011).

5. Conclusão

Neste trabalho foi estimada a exposição ocupacional a formaldeído (FA) de um grupo de profissionais dos serviços de anatomia patológica e estudado o dano genético induzido pela exposição a este composto.

O nível médio de exposição a FA obtido nos serviços de anatomia patológica estudados indica que os profissionais destes laboratórios estão expostos a FA, o que indicia uma situação de risco profissional.

Relativamente aos biomarcadores de efeito analisados, aberrações cromossómicas (AC) e teste do cometa, observou-se que os indivíduos expostos apresentavam níveis de dano genético significativamente mais elevados quando comparados com os do grupo controlo. Estes resultados confirmam a situação de risco profissional.

Tendo em consideração os resultados obtidos, devem-se desenvolver ações corretivas para a diminuição da exposição a FA. A situação ideal seria a substituição do FA, por outro composto químico com propriedades semelhantes e menos tóxico para a saúde humana. Na impossibilidade dessa substituição, devem adoptar-se medidas, que reduzam ao mínimo o risco de exposição ocupacional, de modo a salvaguardar a saúde dos trabalhadores e o ambiente que os rodeia. Uma das principais medidas assenta na instalação de equipamentos de ventilação eficientes e complementados com sistema de exaustão, assim como a utilização adequada de material de proteção individual que não interfira com as tarefas do trabalhador. Ao nível do armazenamento dos reagentes o ideal seria possuir armários com ventilação e exaustão direta para o exterior. Se possível a tarefa de eliminação de peças com as respetivas soluções deverá ser realizada por empresas especializadas na eliminação de resíduos hospitalares.

Torna-se assim evidente que as principais medidas assentam na prevenção e minimização dos riscos da exposição a FA. Estas acções preventivas e/ou correctivas podem ser colocadas em prática através da sensibilização dos trabalhadores para os riscos do seu manuseamento, implementação de boas práticas de trabalho, monitorização periódica do ar ambiente no local de trabalho e vigilância médica regular de modo a salvaguardar a saúde dos trabalhadores.

Bibliografia

- ACGIH. (2010). 2010 TLVs and BEIs: based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological exposure indices. Cincinnati, Ohio: ACGIH Signature Publications.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety. Mutation research*, 463(2), 111–172.
- Albertini, Richard J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Tice, R. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111–172.
- Almeida, C., Carvalho, C., Oliveira, J., Marinho, N., Cardoso, S. (2000). Formaldeído: Um problema de Saúde no ICBAS? ICBAS, Porto.
- Almeida Santos, M. F. M., Ferrari, I., Luna, H. (2005). Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. *Environmental Research*, 97(3), 330–334. doi:10.1016/j.envres.2004.09.013
- Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 1(2), 124–132. doi:10.1590/S1415-790X2003000200009
- Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3-4), 201–228. doi:10.1016/j.ijheh.2007.01.024
- Anwar, W. A. (1994). Monitoring of human populations at risk by different cytogenetic end points. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 4), 131–134.
- Appelman, L. M., Woutersen, R. A., Zwart, A., Falke, H. E., Feron, V. J. (1988). One-year inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats with a damaged or undamaged nasal mucosa. *Journal of applied toxicology: JAT*, 8(2), 85–90.
- ATSDR. (1999). Toxicological Profile for Formaldehyde.
- Aubert, G., Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and Aging. *Physiological Reviews*, 88(2), 557–579. doi:10.1152/physrev.00026.2007
- Beane Freeman, L. E., Blair, A., Lubin, J. H., Stewart, P. A., Hayes, R. B., Hoover, R. N., Hauptmann, M. (2009). Mortality From Lymphohematopoietic Malignancies Among Workers in Formaldehyde Industries: The National Cancer Institute Cohort. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 751–761. doi:10.1093/jnci/djp096

- Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers-Current perspectives. Retrieved from <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/135557>
- Binetti, R., Costamagna, F. M., Marcello, I. (2006). Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 42(2), 132–143.
- Boffetta, P., van der Hel, O., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Bonassi, S. (2006). Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Results of a Cohort Study from Central Europe. *American Journal of Epidemiology*, 165(1), 36–43. doi:10.1093/aje/kwj367
- Bogen, K. T. (1993). Reassessment of human peripheral T-lymphocyte lifespan deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation [abstract]. *International journal of radiation biology*, 64(2), 195–204.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalprà, L., De Ferrari, M., Bonassi, S. (1997). Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 6(4), 249–256.
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Stromberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Boffetta, P. (2008). Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29(6), 1178–1183. doi:10.1093/carcin/bgn075
- Bonassi, Stefano, Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prà, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Padovani, P. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer genetics and cytogenetics*, 79(2), 133–135.
- Bonassi, Stefano, Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625–631. doi:10.1093/carcin/bgl177
- Carbonell, E., Valbuena, A., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R. (1995). Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 344(3), 127–134.
- Carrano, A. V., Natarajan, A. T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 204(3), 379–406. doi:10.1016/0165-1218(88)90036-5

- Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Ramirez, M. J., Casado, J. A., Talavera, M., Surrallés, J. (2011). Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *Journal of Medical Genetics*, 48(4), 242–250. doi:10.1136/jmg.2010.084210
- Celik, M., Donbak, L., Unal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., Yılmaz, S. (2007). Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(2), 158–163. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.11.003
- Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Sailaja, N., Rahman, M. F., Reddy, J. P., Mahboob, M., Grover, P. (2006). Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis*, 21(4), 249–254. doi:10.1093/mutage/gel029
- Chinelato, A. R., Froes, N. (2002). Efeitos genotóxicos em profissionais expostos aos anestésicos inalatórios. *Revista Brasileira Anestesiologia*, 52, 79–85.
- Coggon, D., Harris, E. C., Poole, J., Palmer, K. T. (2003). Extended Follow-Up of a Cohort of British Chemical Workers Exposed to Formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(21), 1608–1615. doi:10.1093/jnci/djg046
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. doi:10.1385/MB:26:3:249
- Costa, C., Teixeira, J. P., Silva, S., Roma-Torres, J., Coelho, P., Gaspar, J., Mayan, O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 21(5), 343–350. doi:10.1093/mutage/gel039
- Costa, Carla, Teixeira, J. P., Mayan, O. (2008). Chapter III: Pesticides as Genetic Damage Inducers. In *Progress in Damage Research*. Nova Science Publishers, Inc.
- Costa, S. (2008). Avaliação do Efeito Genotóxico do Formaldeído em Profissionais do Serviço de Anatomia Patológica. Universidade Católica Portuguesa.
- Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Mayan, O., Santos, L. S., Teixeira, J. P. (2008). Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*, 252(1-3), 40–48. doi:10.1016/j.tox.2008.07.056
- Costa, S., Pina, C., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Porto, B., Teixeira, J. P. (2011). Occupational Exposure to Formaldehyde: Genotoxic Risk Evaluation By Comet Assay And Micronucleus Test Using Human Peripheral Lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(15-16), 1040–1051. doi:10.1080/15287394.2011.582293

- DeMarini, D. M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2-3), 447–474. doi:10.1016/j.mrrev.2004.02.001
- Dreyfuss, J. H. (2010). Occupational Formaldehyde Exposure Linked to Increased Risk of Myeloid Leukemia and Death. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(3), 135–136. doi:10.3322/caac.20071
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T., Kaya, F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International*, 33(7), 877–885. doi:10.1016/j.envint.2007.04.003
- European Commission. (2009). Health Effects of Exposure to EMF. Brussels.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37–59.
- Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Kevekordes, S., Mersch-Sundermann, V. (2004). Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. *Toxicology*, 198(1-3), 341–350. doi:10.1016/j.tox.2004.02.010
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental health perspectives*, 101(Suppl 3), 101.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81–95.
- Ferro, A., Ponte, A., Silva, A., Viegas, C., Quintino, F., Albuquerque, P., Viegas, S. (2005). A qualidade do ar interior nos serviços de anatomia patológica. *Revista Segurança*, (167), 45–50.
- FormaCare. (2013). The EU Formaldehyde Market. Retrieved October 16, 2013, from <http://www.formacare.org/index.php?page=eu-market>
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33(8), 845–853.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R. (2000). Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation research*, 468(2), 93–108.
- Giannotti, E. (2002). A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. *Mutagenesis*, 17(2), 163–170. doi:10.1093/mutage/17.2.163
- Gil, F., Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 21(4), 245–255. doi:10.1002/jat.769

- Gil, O. M. (2000). Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis*, 15(1), 69–75. doi:10.1093/mutage/15.1.69
- Hagmar, L. (2004). Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk: Results from Nordic and Italian Cohorts. *Cancer Research*, 64(6), 2258–2263. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3360
- Hagmar, Lars, Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research*, 58(18), 4117–4121.
- Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F., Suter, W. (2003). Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 536(1-2), 27–38. doi:10.1016/S1383-5718(03)00035-4
- Hauptmann, M. (2003). Mortality From Lymphohematopoietic Malignancies Among Workers in Formaldehyde Industries. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, 95(21), 1615–1623. doi:10.1093/jnci/djg083
- Hayes, R. B., Klein, S., Suruda, A., Schulte, P., Boeniger, M., Stewart, P., Oesch, F. (1997). O6-Alkylguanine DNA alkyltransferase activity in student embalmers. *American Journal of Industrial Medicine*, 31(3), 361–365. doi:10.1002/(SICI)1097-0274(199703)31:3<361::AID-AJIM13>3.0.CO;2-Z
- He, J. L., Jin, L. F., Jin, H. Y. (1998). Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay [Abstract]. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 11(1), 87–92.
- Heck, H. D., Casanova-Schmitz, M., Dodd, P. B., Schachter, E. N., Witek, T. J., Tosun, T. (1985). Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions. *American Industrial Hygiene Association journal*, 46(1), 1–3. doi:10.1080/15298668591394275
- Hedberg, J. (2001). Function, expression and polymorphism of human alcohol dehydrogenase 3/glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Stockholm.
- Hedner, K., Högstedt, B., Kolnig, A. M., Mark-Vendel, E., Strömbeck, B., Mitelman, F. (1982). Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Human genetics*, 62(4), 305–309.
- Heuser, V. D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*, 232(3), 235–247. doi:10.1016/j.tox.2007.01.011

- Holmstrom, M., Lund, V. J. (1991). Malignant melanomas of the nasal cavity after occupational exposure to formaldehyde. *British journal of industrial medicine*, 48(1), 9–11.
- Hughes, W. W. (1996). *Essentials of environmental toxicology: the effects of environmentally hazardous substances on human health*. Washington, DC: Taylor & Francis.
- IARC. (1995). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans . Vol. 62 (Vol. Vol. 62). International Agency for Research on Cancer.
- IARC. (2006). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 88, Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 2 - 9 June 2004. Lyon: IARC.
- IARC. (2012). A review of human carcinogens. International Agency for Research on Cancer.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Sari-Minodier, I., Baciuchka-Palmaro, M., Botta, A., Orsière, T. (2007). Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutation research*, 615(1-2), 18–27. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.005
- Im, H., Oh, E., Mun, J., Khim, J.-Y., Lee, E., Kang, H.-S., Sul, D. (2006). Evaluation of Toxicological Monitoring Markers Using Proteomic Analysis in Rats Exposed to Formaldehyde. *Journal of Proteome Research*, 5(6), 1354–1366. doi:10.1021/pr050437b
- Inoue, K., Nishimukai, H., Yamasawa, K. (1979). Purification and partial characterization of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 569(2), 117–123.
- IPCS. (2000). *Human exposure assessment*. Geneva: World Health Organization.
- IPQ. (2007). *Projecto de Norma Portuguesa, prNP 1796*.
- Ishidate, M., Miura, K. F., Sofuni, T. (1998). Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 404(1-2), 167–172. doi:10.1016/S0027-5107(98)00110-9
- Jakab, M. G., Klupp, T., Besenyi, K., Biró, A., Major, J., Tompa, A. (2010). Formaldehyde-induced chromosomal aberrations and apoptosis in peripheral blood lymphocytes of personnel working in pathology departments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 698(1-2), 11–17. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.02.015

- Jiang, S., Yu, L., Cheng, J., Leng, S., Dai, Y., Zhang, Y., Zheng, Y. (2010). Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695(1-2), 9–15. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.09.011
- Khalil, A. M. (1995). Chromosome aberrations in blood lymphocytes from petroleum refinery workers. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 28(2), 236–239.
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Lee, J.-T. (2011). Exposure to formaldehyde and its potential human health hazards. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 29(4), 277–299. doi:10.1080/10590501.2011.629972
- Kumaravel, T. S., Jha, A. N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1-2), 7–16. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.03.002
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N. (2007). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53–64. doi:10.1007/s10565-007-9043-9
- Kuo, H.-W., Jian, G.-J., Chen, C.-L., Liu, C.-S., Lai, J.-S. (1997). White blood cell count as an indicator of formaldehyde exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 59(2), 261–267.
- Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. (2002). Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*, 171(2-3), 175–186. doi:10.1016/S0300-483X(01)00572-8
- Laffon, B., Teixeira, J. P., Silva, S., Roma-Torres, J., Pérez-Cadahía, B., Méndez, J., Mayan, O. (2006). Assessment of occupational genotoxic risk in the production of rubber tyres. *The Annals of occupational hygiene*, 50(6), 583–592. doi:10.1093/annhyg/mel036
- Lander, F., Knudsen, L. E., Gamborg, M., Järventaus, H., Norppa, H. (2000). Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 26(5), 436–442. doi:10.5271/sjweh.565
- Landi, S., Barale, R. (1999). Sister Chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis*, 14(6), 581–585.

- Latorre, N., Silvestre, J. F., Monteagudo, A. F. (2011). [Allergic contact dermatitis caused by formaldehyde and formaldehyde releasers]. *Actas dermo-sifiliográficas*, 102(2), 86–97. doi:10.1016/j.ad.2010.09.004
- Liu, Y., Li, C. M., Lu, Z., Ding, S., Yang, X., Mo, J. (2006). Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 11, 991–997.
- Luce, D., Leclerc, A., Bégin, D., Demers, P. A., Gérin, M., Orlowski, E., Bolm-Audorff, U. (2002). Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case–control studies. *Cancer Causes & Control*, 13(2), 147–157.
- Maluf, S. W. (2004). Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 347(1-2), 15–24. doi:10.1016/j.cccn.2004.04.010
- Manikantan, P., Balachanadar, V., Sasikala, K., Mohanadevi, S., Arun, M., Kumar, A. K., Kumar, S. S. (2010). Cytogenetic methods for assessing human exposure to toluene in Coimbatore, South India. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11(6), 1687–1693.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515–1531. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.004
- Mayan, O., Lamcomblez, M., Capela, F., Pinto, L., Freitas, I., Coelho, J. (1995). Formaldeído - Contribuição para o Estudo de alguns dos seus Efeitos numa População de Técnicos de laboratório. *Revista Saúde e Trabalho*, 1(1), 9–51.
- Moller, P. (2006). Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2), 84–104. doi:10.1016/j.mrrev.2005.10.001
- Monticello, T. M., Swenberg, J. A., Gross, E. A., Leininger, J. R., Kimbell, J. S., Seilkop, S., Morgan, K. T. (1996). Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Research*, 56(5), 1012–1022.
- Musak, L., Smerhovsky, Z., Halasova, E., Osina, O., Letkova, L., Vodickova, L., Vodicka, P. (2013). Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. doi:10.5271/sjweh.3358
- Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 3–16.

- Neuberger, A. (1961). Aspects of the metabolism of glycine and of porphyrins. *The Biochemical Journal*, 78(1), 1–9.
- NIOSH. (1994, August). FORMALDEHYDE by VIS - NIOSH 3500.
- NTP. (2011). Report on Carcinogens - Twelfth Edition. National Toxicology Program.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Drets, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 17–36.
- Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation research*, 122(1), 86–94.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Iarmarcovai, G., Botta, A. (2006). Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes. *Mutation research*, 605(1-2), 30–41. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.01.006
- OSHA. (2013). Apêndice C - Formaldeído OSHA. Retrieved October 16, 2013, from https://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=10078
- Pala, M., Ugolini, D., Ceppi, M., Rizzo, F., Maiorana, L., Bolognesi, C., Vecchio, D. (2008). Occupational exposure to formaldehyde and biological monitoring of Research Institute workers. *Cancer Detection and Prevention*, 32(2), 121–126. doi:10.1016/j.cdp.2008.05.003
- Paz-y-Miño, C., Dávalos, M. V., Sánchez, M. E., Arévalo, M., Leone, P. E. (2002). Should gaps be included in chromosomal aberration analysis?: evidence based on the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516(1), 57–61.
- Pinkerton, L. E. (2004). Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: an update. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(3), 193–200. doi:10.1136/oem.2003.007476
- Pivetta, F., Machado, J. M. H., Araújo, U. C., Moreira, M. de F. R., Apostoli, P. (2001). Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública Biological monitoring: concepts and applications in public health. *Cad. Saúde Pública*, 17(3), 545–554.
- Policy and Research Division. (2009). Occupational Exposure Limits for Formaldehyde (p. pps 69).
- Prista, J., Uva, A. de S. (2006). A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, Volume Temático 6, 45–54.

- Ramsey, M. J., Moore, D. H., Briner, J. F., Lee, D. A., Olsen, L. A., Senft, J. R., Tucker, J. D. (1995). The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutation Research/DNAging*, 338(1-6), 95–106. doi:10.1016/0921-8734(95)00015-X
- Ridpath, J. R., Nakamura, A., Tano, K., Luke, A. M., Sonoda, E., Arakawa, H., Nakamura, J. (2007). Cells Deficient in the FANC/BRCA Pathway Are Hypersensitive to Plasma Levels of Formaldehyde. *Cancer Research*, 67(23), 11117–11122. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3028
- Rojas, E., Lopez, M. C., Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1), 225–254.
- Roma-Torres, J., Teixeira, J. P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L. M., Méndez, J., Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2), 19–27. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.12.005
- Rooney, D. E., Czepulkowski, B. H. (1996). *Human Chromosome Preparation: essential techniques*. Canada: Wiley.
- Santovito, A., Schilirò, T., Castellano, S., Cervella, P., Bigatti, M. P., Gilli, G., DelPero, M. (2011). Combined analysis of chromosomal aberrations and glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in pathologists occupationally exposed to formaldehyde. *Archives of Toxicology*, 85(10), 1295–1302. doi:10.1007/s00204-011-0668-3
- Savage, J. R. (1975). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, 13(2), 103–122.
- Schulte, A. (2006). Assessment of the carcinogenicity of Formaldehyde (CAS No. 50-00-5): Bericht zur Bewertung der Karzinogenität von Formaldehyd. Berlin: BfR, Pressestelle.
- SCOEL. (2008). Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Formaldehyde. SCOEL/SUM/125 (p. 21). Retrieved from <http://ec.europa.eu/social/keyDocuments.jsp?policyArea=&type=0&country=0&year=0&advSearchKey=formaldehyde&mode=advancedSubmit&langId=en>
- Shaham, J., Gurvich, R., Kaufman, Z. (2002). Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1), 115–123.
- Silbergeld, E. K. (2001). TOXICOLOGIA: Herramientas y Enfoques. In *ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO*.

- Silbergeld, E. K., Davis, D. L. (1994). Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clinical chemistry*, 40(7), 1363–1367.
- Singh, R. K., Mishra, S. K., Kumar, N., Singh, A. K. (2010). Assessment of DNA damage by comet assay in lymphocytes of workers occupationally exposed to petroleum fumes. *Int J Gen*, 2, 18–22.
- Sul, D., Kim, H., Oh, E., Phark, S., Cho, E., Choi, S., Jung, W.-W. (2007). Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde. *Archives of Toxicology*, 81(8), 589–597. doi:10.1007/s00204-007-0182-9
- Suruda, A., Schulte, P., Boeniger, M., Hayes, R. B., Livingston, G. K., Steenland, K., Fingerhut, M. A. (1993). Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2(5), 453–460.
- Takeuchi, Y. (2009). Health effects from exposure to chronic levels of industrial chemicals. In *Environmental Toxicology and Human Health*.
- Tang, X., Bai, Y., Duong, A., Smith, M. T., Li, L., Zhang, L. (2009). Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environment International*, 35(8), 1210–1224. doi:10.1016/j.envint.2009.06.002
- Teixeira, J. P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S. N., Azevedo, M. C., Rueff, J. (2004). Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*, 195(2-3), 231–242. doi:10.1016/j.tox.2003.10.010
- Teng, S., Beard, K., Pourahmad, J., Moridani, M., Easson, E., Poon, R., O'Brien, P. J. (2001). The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, 130, 285–296.
- Thomson, E. J., Shackleton, S., Harrington, J. M. (1984). Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange frequencies in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde [Abstract]. *Mutation research*, 141(2), 89–93.
- Uotila, L., Koivusalo, M. (1974). Formaldehyde Dehydrogenase from Human Liver PURIFICATION, PROPERTIES, AND EVIDENCE FOR THE FORMATION OF GLUTATHIONE THIOL ESTERS BY THE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry*, 249(23), 7653–7663.
- Uva, A., FARIA, M. (2000). Exposição profissional a substâncias químicas: diagnóstico das situações de risco. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 18(1), 5–10.
- Viegas, S., Ladeira, C., Nunes, C., Malta-Vacas, J., Gomes, M., Brito, M., Prista, J. (2010). Genotoxic effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in

- anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 5(1), 25. doi:10.1186/1745-6673-5-25
- Viegas, S., Prista, J. (2009). Exposição profissional a formaldeído – que realidade em Portugal? *SAÚDE & TECNOLOGIA*, (4), 46–53.
- Vodicka, P., Tuimala, J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Hemminki, K. (2004). Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers. *Environmental health perspectives*, 112(8), 867–871.
- Vuyyuri, S. B., Ishaq, M., Kuppala, D., Grover, P., Ahuja, Y. R. (2006). Evaluation of micronucleus frequencies and DNA damage in glass workers exposed to arsenic. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(7), 562–570. doi:10.1002/em.20229
- Wang, M., Cheng, G., Balbo, S., Carmella, S. G., Villalta, P. W., Hecht, S. S. (2009). Clear Differences in Levels of a Formaldehyde-DNA Adduct in Leukocytes of Smokers and Nonsmokers. *Cancer Research*, 69(18), 7170–7174. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1571
- WHO. (1989). *Environmental Health Criteria 89: Formaldehyde* (p. 219 pps.). Geneva: WHO.
- WHO. (2000). *Air quality guidelines for Europe*. Retrieved May 21, 2013, from <http://site.ebrary.com/id/10040321>
- Wojda, A., Witt, M. (2003). Manifestations of ageing at the cytogenetic level. *Journal of applied genetics*, 44(3), 383–400.
- Wolff, S., Afzal, V., Wiencke, J. K., Olivieri, G., Michaeli, A. (1988). Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 53(1), 39–47.
- Wong, J. W., Ngim, K. K., Eiserich, J. P., Yeo, H. C. H., Shibamoto, T., Mabury, S. A. (1997). Determination of Formaldehyde in Cigarette Smoke. *Journal of Chemical Education*, 74(9), 1100. doi:10.1021/ed074p1100
- World Health Organization. (2010). *WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants*. Copenhagen: WHO.
- Ye, X., Yan, W., Xie, H., Zhao, M., Ying, C. (2005). Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 588(1), 22–27. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.08.005

- Yu, L., Jiang, S., Leng, S., He, F., Zheng, Y. (2005). [Early genetic effects on workers occupationally exposed to formaldehyde]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine], 39(6), 392–395.
- Zeljezic, D. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*, 16(4), 359–363. doi:10.1093/mutage/16.4.359
- Zhang, L., Tang, X., Rothman, N., Vermeulen, R., Ji, Z., Shen, M., Lan, Q. (2010). Occupational Exposure to Formaldehyde, Hematotoxicity, and Leukemia-Specific Chromosome Changes in Cultured Myeloid Progenitor Cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(1), 80–88. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0762

ANEXO I

Figuras



Figura 13- Gap num cromossoma com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)



Figura 14 – Quebra num cromossoma com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)

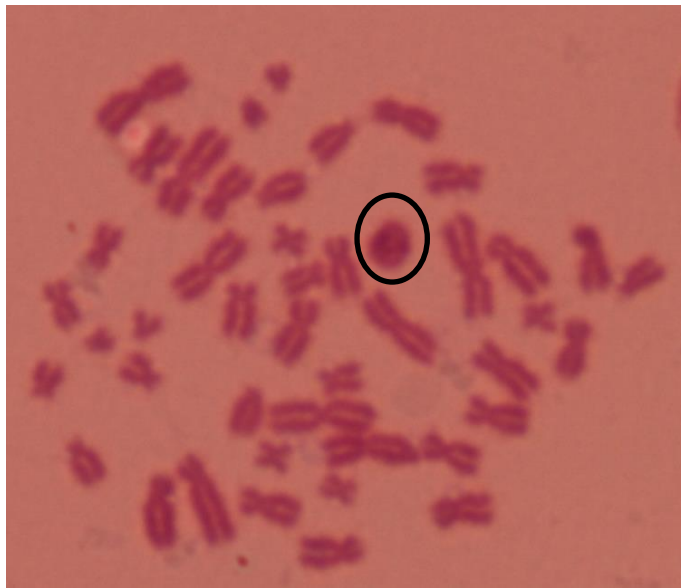


Figura 15 – Cromossoma em anel com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)



Figura 16 – Cromossoma dicêntrico e fragmento com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)



Figura 17 - Figura Homóloga com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)



Figura 18 - Figura Radial com ampliação 1250x (ocular, 12.5x; objetiva 100x)



Figura 19 - Interchange com ampliação 1250x (ocular 12.5x; objetiva 100x)

ANEXO II

Consentimento Informado

**AVALIAÇÃO DE RISCO DA EXPOSIÇÃO AO FORMALDEÍDO.
ANÁLISE DO DANO GENÉTICO E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA EM
PROFISSIONAIS DE ANATOMIA PATOLÓGICA.**

Declaração de Consentimento

Fui informado sobre os objetivos do estudo e compreendi com clareza o que me é pedido, como participante.

Fui ainda informado que:

- 1- Os dados que fornecer, bem como os resultados das análises que forem efetuadas sobre as amostras do meu sangue, urina e esfregaço bucal serão estritamente confidenciais. Assim que os procedimentos do estudo o permitam esses dados e resultados serão tornados anónimos, isto é, deixarão de poder ser relacionados com a minha identificação;
- 2- Todos os investigadores e técnicos envolvidos neste estudo e que utilizam esses dados são afetos ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.) pelo que de acordo com a política da Qualidade, Ambiente e Segurança do INSA, I.P. estão obrigados a manter a confidencialidade das informações a que tem acesso no âmbito da sua atividade.

Nestas condições, declaro que aceito participar no estudo, disponibilizando-me para:

- 1- Ser entrevistado e prestar informações sobre vários aspetos respeitantes a condições de saúde bem como a algumas características sócio-demográficas relevantes;
- 2- Permitir a colheita de uma amostra de sangue, urina e esfregaço bucal para posterior análise laboratorial.

Data: ____/____/____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

ANEXO III

Questionário



Avaliação de Risco da Exposição ao Formaldeído.

Análise do dano genético e suscetibilidade genética em Profissionais de Anatomia Patológica.

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

Amostra recolhida por: _____ Data: ____/____/____

Hora: _____

A) Caracterização sociodemográfica:

1. Data de Nascimento : ____/____/____ (Idade=____anos)

2. Sexo: **M** ☐ **F** ☐

3. Altura: _____ Peso: _____

4. Naturalidade: _____ Localidade onde reside: _____

B) Atividade Profissional:

5. Atividade profissional: _____

6.1 Posto de trabalho: _____ 6.2 Há quanto tempo a exerce: _____

7. Em que consiste: _____

8. Usa algum tipo de equipamento de **proteção individual**? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

8.1 Qual? _____

9. Exerce a sua atividade profissional noutra local: **SIM** ☐ **NÃO** ☐

9.1 Quantas horas por semana? _____

10. Profissões anteriores: _____ Período: _____



Avaliação de Risco da Exposição ao Formaldeído.

Análise do dano genético e suscetibilidade genética em Profissionais de Anatomia Patológica.

C) CARATERIZAÇÃO DE ESTILO DE VIDA E SAÚDE:

C₁) Consumo de Álcool

11. Consumo☐

Que quantidade de álcool consome em média, por dia? _____

Que tipo de bebida alcoólica bebe habitualmente? _____

12. Não consumo☐

C₂) Hábitos Tabágicos

13. É atualmente fumador? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

Se é fumador:

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Quantos cigarros fuma por dia? _____

14. Alguma vez fumou? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

Se é ex-fumador:

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Com que idade deixou de fumar? _____ anos

15. Se é fumador passivo:

Tem contato regular durante 2 ou mais horas com fumadores?

Em casa **SIM** ☐ **NÃO** ☐No trabalho **SIM** ☐ **NÃO** ☐No café ou similar **SIM** ☐ **NÃO** ☐

C₃) Historial Clínico

16. Sofre de alergias respiratórias? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

Avaliação de Risco da Exposição ao Formaldeído.

Análise do dano genético e suscetibilidade genética em Profissionais de Anatomia Patológica.

Se respondeu **SIM** :

16.1. Só desde que comecei a exercer a minha atual função.....☐

16.2. Sempre sofri.....☐

Se **sempre sofreu**, sente que houve um agravamento desde que começou a exercer a sua atual atividade profissional ? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

17. Costuma sentir alguma da sintomatologia seguinte?

17.1. Irritação na garganta.....☐

17.2. Irritação no nariz.....☐

17.3. Irritação nos olhos.....☐

17.4. Aumento do lacrimejar.....☐

17.5. Outros.....☐ Qual/Quais ? _____

Se assinalou algum sintoma, pode especificar a altura do dia ou da semana em que sente mais?

18. No último ano fez algum tipo de Exame radiológico (Raios X)? **SIM** ☐ **NÃO** ☐
Qual? _____

19. Nos últimos 2 meses teve algum problema de saúde? **SIM** ☐ **NÃO** ☐
Qual? _____

20. No último ano foi submetido(a) a alguma intervenção cirúrgica? **SIM** ☐ **NÃO** ☐
Qual? _____

21. Toma algum tipo de medicação? **SIM** ☐ **NÃO** ☐
Qual/Quais? _____

**Avaliação de Risco da Exposição ao Formaldeído.****Análise do dano genético e suscetibilidade genética em Profissionais de Anatomia Patológica.**

22. Alguma vez tomou ou toma pílula contraceptiva ou faz terapêutica hormonal de substituição? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

Há quanto tempo? _____

23. Tomou alguma vacina nos últimos 12 meses? **SIM** ☐ **NÃO** ☐

Qual? _____

C₄) Hábitos Alimentares

24.1. Consumo de chá..... **NÃO** ☐ **SIM** ☐ Frequência _____

24.2. Consumo de café..... **NÃO** ☐ **SIM** ☐ Frequência _____

24.3. Consumo de fruta..... **NÃO** ☐ **SIM** ☐ Frequência _____

24.4. Consumo de vegetais..... **NÃO** ☐ **SIM** ☐ Frequência _____

24.5. Consumo de peixe e carne (por semana) **peixe** _____ **carne** _____

24.5. Consumo de suplementos vitamínicos...**NÃO** ☐ **SIM** ☐ Frequência _____

